

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE
CREATINA EM RATOS COM TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO SOBRE A
SUSCETIBILIDADE A CRISES EPILÉPTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Maurício Scopel Hoffmann

2013

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA EM
RATOS COM TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO
SOBRE A SUSCETIBILIDADE À CRISES EPILÉPTICAS**

Maurício Scopel Hoffmann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de:
Mestre em Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Michele Rechia Figuera
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Hoffmann, Maurício Scopel
Avaliação da suplementação de creatina em ratos com traumatismo cranioencefálico sobre a suscetibilidade a crises epilépticas / Maurício Scopel Hoffmann.-2013.
80 f.; 30cm

Orientador: Michele Rechia Figuera
Coorientador: Luiz Fernando Freire Royes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Traumatismo Cranioencefálico 2. Epilepsia 3.
Creatina I. Figuera, Michele Rechia II. Royes, Luiz
Fernando Freire III. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Maurício Scopel Hoffmann. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Av. Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105-900

Fone (055) 3220-9378; E-mail: mauriciodireito@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

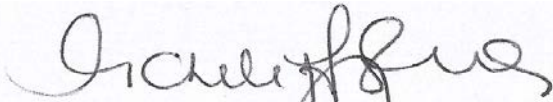
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA EM RATOS
COM TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO SOBRE A
SUSCETIBILIDADE A CRISES EPILÉPTICAS**

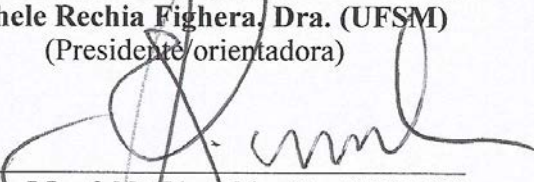
elaborada por
Maurício Scopel Hoffmann

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

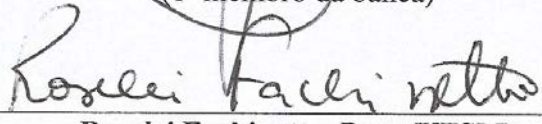
COMISSÃO EXAMINADORA:



Michele Rechia Fighera, Dra. (UFSM)
(Presidente orientadora)



Marino Muxfeldt Bianchin, Dr. (UFRGS)
(1º membro da banca)



Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)
(2º membro da banca)

Santa Maria, 02 de março de 2013.

Dedicado aos amigos do Labneuro e Bioex da UFSM

AGRADECIMENTOS

Nascido em ambiente universitário, a exposição constante às rotinas do conhecimento foram importantes para a motivação e empenho em buscar um ambiente no qual eu pudesse desenvolver as habilidades mínimas de um cientista. Hoje, sei que tive muita sorte em nascer na família do Ronaldo e Rejane, meus pais, os quais me deram todo apoio sentimental, moral, intelectual e também tiveram muita paciência para que pudesse seguir o caminho que escolhi.

Nesse caminho, a Milena está comigo há mais de 10 anos. Foi meu ponto de sensatez e equilíbrio por diversas vezes, não me deixando desviar dos objetivos e sempre pensar no que valia a pena fazer. Através do amor, as descobertas das mais diversas faces da vida acadêmica foram se revelando suaves e sóbrias.

Bom, nem sempre sóbrias. As amizades construídas no ambiente profissional também são embriagantes. Em quase sete anos de Labneuro/Bioex, as atividades acadêmicas transcenderam o mero conceito de trabalho e atingiu a utopia do “prazer em trabalhar”. As discussões científicas, por mais calorosas, nunca se tornavam pessoais e isso é uma qualidade rara na academia, impar, a qual torna esses laboratórios da UFSM, únicos. O apoio incondicional dado a um estranho recém chegado de outro curso que “se metia” nos seminários foi o passo inicial e fundamental que permitiram com que pudesse equilibrar o curso de medicina com a iniciação científica. Pouco mérito posso reivindicar. Por isso, dedico esse trabalho aos amigos Luiz Fernando Almeida Silva, Leonardo Rambo, Leandro Ribeiro, Mauren Souza, Frederico Lima, Iuri Della-Pace, Rogério Gerbatin, André Saraiva, Ana Paula Ferreira, Leandro Retamoso, Danieli Magni, Daniel Stamm, Bibiana Mota, Fernanda Rodrigues, Fernando Fiorin, Guilherme Busanello e Mauro de Castro. Também, em especial, dedico aos responsáveis por unir e acolher essas pessoas. Como nossos primeiros exemplos de doutorandos e agora jovens e inspiradores professores, Mauro Oliveira e Ana Flávia Furian. Aos meus orientadores Michele Fighera e Luiz Fernando Royes por me acolherem durante todo esse tempo e lidar diretamente com minhas opiniões. Sei que não deve ter sido fácil. Por último, agradeço imensamente e dedico também esse trabalho ao professor Carlos Fernando de Mello, por ter aberto as portas primeiro e acompanhar todos no caminho; serei sempre grato pelos ensinamentos e sábios conselhos. Por fim, agradeço à UFSM e órgãos de fomento, em especial a FAPERGS, que tornaram possíveis percorremos os caminhos da ciência.

You can't always get what you want
But if you try sometimes,
You just might find
You get what you need!

(Mick Jagger e Keith Richards)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AValiação da Suplementação de Creatina em Ratos COM TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO SOBRE A

SUSCETIBILIDADE A CRISES EPILÉPTICAS

AUTOR: MAURÍCIO SCOPEL HOFFMANN

ORIENTADORA: MICHELE RECHIA FIGHERA

CO-ORIENTAÇÃO: LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES

Local e Data da Apresentação: Santa Maria, 02 de março de 2013

Este trabalho apresenta uma análise dos efeitos da suplementação de creatina sobre parâmetros de suscetibilidade à crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em dose subconvulsivante, por modelo experimental de traumatismo cranioencefálico (TCE) em ratos. O traumatismo cranioencefálico (TCE) é um evento neurológico agudo que pode levar à doença neurológica crônica, como a epilepsia. Devido a magnitude do problema, diversas formas terapêuticas vêm sendo testadas, porém muitas falharam e ainda, poucas levam em conta o desfecho da suscetibilidade à crises epilépticas, além de se concentrarem em um período muito precoce da patologia, ficando longe da realidade dos pacientes de países subdesenvolvidos. A creatina consiste num interessante composto a ser avaliado para esse fim, já que apresenta propriedades neuromoduladoras e de regulação da plasticidade sináptica em neurônios em desenvolvimento. Assim, tornou-se interessante investigar se existe algum efeito da creatina nesse cenário. Para isso, realizou-se suplementação de creatina por gavagem em ratos submetidos ao TCE por percussão de fluído, iniciada esta suplementação uma semana após o TCE, uma vez ao dia, por quatro semanas, sendo o teste com PTZ realizado duas horas após a última dose. Também foi realizado um protocolo semelhante para verificar se o efeito da creatina era duradouro e outro, para verificar o efeito agudo, logo antes do teste com PTZ. Foram mensurados o tempo de latência para crises mioclônica e tônico clônica generalizada, tempo total de crise generalizada, gravidade da crise através da escala de Racine, bem como quantificada as descargas epileptiformes e ondas de fuso antes e após a administração de PTZ. Como resultados principais, encontrou-se a diminuição da suscetibilidade à crises epilépticas nos ratos suplementados por um mês, e o efeito permaneceu mesmo quando houve retirada da creatina por uma semana adicional, porém, esse efeito não foi observado na administração única do composto. Também houve correlação positiva do aparecimento de descargas epileptiformes e atividades de fuso, ambas reduzidas nos animais suplementados continuamente. Assim, a creatina apresenta-se como substância candidata à testes em estudos com traumatismo cranioencefálico, com a finalidade de diminuir a suscetibilidade à crises epilépticas.

Palavras chave: Traumatismo Cranioencefálico. Creatina. Crise Epiléptica. PTZ.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF CREATINE SUPPLEMENTATION IN TRAUMATIC BRAIN INJURED RATS ON SUSCEPTIBILITY TO SEIZURES

AUTHOR: MAURÍCIO SCOPEL HOFFMANN

ADVISOR: MICHELE RECHIA FIGHERA

CO-ADVISOR: LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES

Date and Place of Presentation: March 2nd, 2013, Santa Maria

This study presents an analysis on the effects of creatine supplementation on parameters of susceptibility to seizures induced by subconvulsant dose of pentylenetetrazol (PTZ) in an experimental rat model of traumatic brain injury (TBI). TBI is an acute neurological event that can lead to chronic neurological disease, such as epilepsy. Given the magnitude of the problem, various forms of therapy is being tested, but many have failed and yet, few take into account the susceptibility to seizures as an outcome and concentrate on a very early period of injury, getting away from the reality of patients in underdeveloped countries. Creatine is an interesting compound to be evaluated for this purpose, since it has neuromodulatory properties and may regulate synaptic plasticity in developing neurons. Thus, it became interesting to investigate whether there is any effect of creatine in this scenario. To this, creatine supplementation was held by gavage in rats subjected to fluid percussion TBI model and this supplementation began one week after TBI, once a day for four weeks. PTZ test was performed two hours after the last dose of creatine. Furthermore a similar protocol was performed to verify the persistence of the effect and secondly, to verify the acute effect of creatine, just before the PTZ test. Latency for myoclonic and tonic clonic seizures, total time of generalized seizure as the clinical severity through the scale of Racine were measured and also epileptiform discharges and spindle activity before and after the administration of PTZ were quantified. As main results, it was found a decreased susceptibility to seizures in rats supplemented by a month, and the effect remained even if there was withdrawal of creatine for a week, however, this effect was not observed in the single dose of the compound. Still, a positive correlation between epileptiform discharges and spindle activity was found, both reduced in animals supplemented continuously. Thus, creatine is presented as a candidate to be tested in studies with TBI, with the purpose of reducing the susceptibility to seizures.

Keywords: Traumatic Brain Injury. Creatine. Seizure. PTZ.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Supplementary table 1 –	Behavioural and biometrical data	59
Table 1 –	Effect of creatine in the relative risk of PTZ-induced tonic-clonic seizure in TBI	60

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 –	Quantidade de testes clínicos em TCE	17
Figura 2 –	Esquema de modelo de TCE por percussão de fluido	21
Figura 3 –	Representação dos circuitos tálamo-corticais	24
Figura 4 –	Expressão dos transportadores de creatina no cérebro de rato	28

ARTIGO

Supplementary Figure 1 –	Desenho experimental	61
Figure 1 –	Resultados dos testes comportamentais do experimento 1	62
Figure 2 –	Resultados dos testes comportamentais do experimento 2	63
Figure 3 –	Resultados dos testes comportamentais do experimento 3	64
Figure 4 –	Correlação de atividades de fuso e epileptiformes	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Difosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

CA - Corno de Amon

CK - Creatina quinase

CMC - Carboximetilcelulose

CO₂ - Dióxido de carbono

CrT - Transportador de creatina

ECoG - Eletrocortigografia

EEG - Eletroencefalograma

EPT - Epilepsia pós-traumática

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GABA-A - Receptor ionotrópico de GABA

i.p. – Intraperitoneal

K_m – Constante de dissociação

MK-801 - (5R,10S) - (+) 5 - Metil - 10,11 - dihidro - 5 H – dibenzo [a,d] ciclohepten - 5,10 - imino hidrogênio maleato

NMDA - N-metil-D-aspartato

p.o. - *per oralis*

pH - Potencial hidrogeniônico

PTZ - Pentilenotetrazol

SNC - Sistema Nervoso Central

t ½ - Meia vida

TCE - Traumatismo cranioencefálico

Vd - Volume de distribuição

V_{max} – velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Delimitação do tema e problemática	12
1.2 Referencial teórico	13
1.2.1 Traumatismo cranioencefálico.....	13
1.2.2 Epilepsia pós traumática.....	18
1.2.3 Modelos experimentais de epilepsia pós traumática e suscetibilidade à convulsão.....	20
1.2.4 Creatina.....	26
1.3 Justificativa	31
1.4 Objetivos	32
1.4.1 Objetivo geral.....	32
1.4.2 Objetivos específicos.....	32
2 ARTIGO	33
2.1 Artigo - Avaliação da suplementação de creatina em ratos com traumatismo cranioencefálico sobre a suscetibilidade à crises epilépticas	33
2.2 Abstract	35
2.3 Introduction	37
2.4 Matherial and Methods	39
2.5 Results	44
2.6 Discussion	47
2.8 References	55
2.9 Tables	59
2.10 Figures	61
3 DISCUSSÃO	66
4 CONCLUSÃO	69
5 REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Delimitação do tema e problemática

Atualmente, o traumatismo cranioencefálico (TCE) é um dos maiores problemas em saúde pública e causa elevado número de mortes em todas as sociedades modernas, através de guerras ou acidentes de trânsito e domésticos (LANGLOIS; RUTLAND-BROWN; WALD, 2006; OLIVEIRA et al., 2012). Diversas terapias são propostas para evitar os danos causados pelo TCE, porém poucas tem sido efetivadas na rotina clínica dos serviços de saúde, bem como a maioria das novas propostas testadas são aplicadas de maneira muito precoce, como 15 minutos (MAAS; ROOZENBEEK; MANLEY, 2010), estando longe de uma possível aplicação no cenário real (DE SILVA et al., 2009).

Uma das principais consequências do TCE são as crises epiléticas que podem ocorrer após esse evento, as quais, quando se tornam recorrentes, caracterizam o quadro de epilepsia pós traumática (EPT) (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010). Entretanto, há poucos estudos que tenham levado em consideração, como desfecho clínico, a suscetibilidade ou o desenvolvimento de crises epiléticas pós traumáticas (MAAS et al., 2010; PITKANEN et al., 2009), e os que estudaram especificamente esse assunto, reportam falhas terapêuticas (TEMKIN, 2009). Assim, devido à escassez de medidas terapêuticas efetivas para esse desfecho clínico, alguns estudos têm investigado novas terapias adjuvantes com o objetivo de auxiliar no tratamento das consequências clínicas desta patologia, como a creatina. Essa já foi testada em modelo animal de TCE, bem como em estudo piloto com pacientes pediátricos vítimas de TCE, com bons resultados (SAKELLARIS et al., 2006; SAKELLARIS et al., 2008; SULLIVAN et al., 2000). Porém, não há estudos com a creatina em relação a seu possível potencial para prevenir a suscetibilidade à crises epiléticas tardias e se ela pode exercer efeito mesmo se administrada tardiamente, assim, se aproximando da realidade das vítimas de TCE (DE SILVA et al., 2009).

1.2 Referencial teórico

1.2.1 Traumatismo cranioencefálico

O TCE é um acometimento comum em todas as sociedades e é causa de grande morbidade e mortalidade (DE SILVA et al., 2009). É definido como uma alteração na função cerebral, ou outra evidência de patologia cerebral, causada por uma força externa (MENON et al., 2010). No Brasil, apesar de haver poucos dados, estima-se que 74% dos TCEs ocorram devido a acidentes de trânsito (OLIVEIRA et al., 2012). Historicamente, pelo menos nos últimos 70 anos, as causas externas ¹ são a segunda maior causa de mortalidade no Brasil (BRASIL, 2004), sendo que cerca de 84,4% das vítimas de violência urbana e acidentes de trânsito possuem algum grau de TCE (CAMARGO et al., 1995 apud OLIVEIRA et al., 2012). Ainda, no Brasil, as maiores vítimas de TCE são adultos jovens, com idade média de 34 anos (DE OLIVEIRA THAIS et al., 2012), promovendo, para os sobreviventes, importante morbidade, devido a duração das sequelas da doença (OLIVEIRA et al., 2012). Em um estudo epidemiológico elogiado por sua metodologia e abrangência (ANDELIC, 2013), Feigin e colaboradores (2013) referem que na Nova Zelândia a incidência do TCE é de 790 por 100.000 pessoas-ano, com traumas moderados e graves compondo 41 casos por 100.000 pessoas-ano, sendo esses maiores em áreas rurais, onde naturalmente o acesso ao serviço de saúde é mais dificultado (DE SILVA et al., 2009). Ainda, de uma forma global, o panorama epidemiológico mostra que cerca de 10 milhões de pessoas sofrem um novo episódio de TCE todos os anos e que cerca de 5,3 milhões de pessoas vivem com deficiências causadas pela doença, o que custou no ano 2000, cerca de US\$ 406 bilhões em custos diretos e indiretos no mundo (FEIGIN et al., 2013).

Uma das dificuldades dos estudos clínicos é homogeneizar as amostras, já que existem diferentes formas de TCE (MAAS et al., 2012; PITKANEN et al., 2009), com diferentes desfechos e prognósticos ainda em estudo. Essa patologia pode ser classificada conforme sua gravidade clínica e mecanismo (MAAS et al., 2012), estes

¹ Compreendem no grupo das causas externas os acidentes de transporte, quedas, morte por arma de fogo, suicídio e agressões (BRASIL, 2004).

avaliados por técnicas de imagem. Quanto à gravidade clínica, pode ser imediatamente classificado conforme a escala de coma de Glasgow (TEASDALE; JENNETT, 1974) entre leve (15-13 pontos), moderado (12-9 pontos) e grave (8-3 pontos), avaliando a melhor resposta ocular, verbal e motora do paciente (SUPORTE AVANÇADO DE VIDA NO TRAUMA, 2004, p. 184). Porém, essa escala pode falhar na orientação prognóstica de pacientes graves, devido possivelmente aos múltiplos fatores que podem levar ao trauma grave (MAAS et al., 2012).

Ainda, com relação a estudos com EPT, a definição de gravidade sofre modificação e o TCE pode ser classificado como leve se a perda de consciência for menor que 30 minutos e não houver fratura óssea, moderado se a perda da consciência for entre 0,5 e 24 horas e com ou sem fratura óssea e grave, se a perda da consciência for maior que 24 horas com contusão, hematoma ou fratura óssea (LOWENSTEIN, 2009).

Com relação aos mecanismos do TCE, esses podem ser classificados em traumas fechados ou penetrantes. Os traumas fechados são aqueles que ocorrem sem o contato do conteúdo da caixa craniana com o meio externo, como nas agressões, acidentes de trânsito, entre outros. Os traumas penetrantes normalmente ocorrem por lesões por armas brancas ou de fogo, bem como qualquer trauma que exponha o conteúdo craniano ao meio externo (SUPORTE AVANÇADO DE VIDA NO TRAUMA, 2004, p. 181).

Conforme a morfologia do trauma, o TCE pode gerar lesões focais ou difusas. Das focais, são referidos os hematomas extradurais, subdurais agudo e crônico e contusões cerebrais, as quais se constituem de áreas heterogêneas de necrose, isquemia, hemorragia e edema (MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, p. 580). Nos traumas difusos, podem ser encontradas lesões como hemorragias subaracnóideas traumáticas, edema cerebral e lesões axonais difusas, que pela força de cisalhamento que ocorre através de mecanismo de aceleração e desaceleração, faz com que as conexões entre corpos neuronais e seus axônios se rompam, bem como os vasos sanguíneos que os nutrem (MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, p. 581). Ainda, podem ocorrer fraturas da calota craniana e da base do crânio, o que revela a intensidade com a qual ocorreu o evento traumático. Existe a possibilidade de todas essas lesões se interporem, gerando lesões mistas (MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, p. 581).

A fisiopatologia do TCE compreende diversos fenômenos. Classicamente, divide-se em dois processos, sendo esses denominados dano primário e secundário

(PITKANEN; MCINTOSH, 2006). O dano primário consiste basicamente nos danos provocados no momento do impacto, como fraturas ósseas, danos axonais, meníngeos, vasculares e morte celular imediata, através de sua ruptura e outros processos (PITKANEN; MCINTOSH, 2006). A abordagem para minimizar essa etapa é a prevenção de acidentes, com o uso de capacetes, cintos de segurança, entre outros dispositivos e medidas educativas e legais que visem diminuir o risco (CASSIDY et al., 2004; FALAVIGNA et al., 2012; JAVOUHEY; GUERIN; CHIRON, 2006). O dano secundário é entendido como o processo que parte do dano primário, ocorrendo entre minutos a anos após o TCE, e envolve múltiplos processos fisiopatológicos, como edema, desequilíbrio hidroeletrólítico, excitotoxicidade, hipóxia-isquemia, trombose e inflamação (PITKANEN; MCINTOSH, 2006). Esse dano inicia um processo de reorganização dos circuitos cerebrais, com necrose e apoptose celulares, neurogênese, gliogênese, angiogênese, entre outros processos plásticos (PITKANEN et al., 2009; PITKANEN et al., 2007). Durante essa fase, os processos subjacentes ocorrem em fases distintas, embora essa distinção não seja bem delimitada. O estresse oxidativo, inflamação e grande parte da morte neuronal ocorrem dentro da primeira semana após o TCE em modelos animais (CEDERBERG; SIESJO, 2010; HARRIS et al., 2012; LESCOT et al., 2010; SINGH et al., 2006) e, embora esse período não seja bem delimitado, a partir da primeira semana, esses processos agudos diminuem e os seus efeitos em relação a organização da circuitaria neuronal começam a surgir, tendo um período de estabilidade de perdas teciduais entre a primeira e quarta semana após o TCE e aumento progressivo a partir dessa fase, sugerindo um ciclo de apoptose constante, originada através dos processos inflamatórios, excitotóxicos e oxidativos precoces (HARRIS et al., 2012; IMMONEN et al., 2009).

Tendo em vista a perspectiva fisiopatológica, diversas formas terapêuticas foram propostas para o tratamento do paciente, visando a manutenção da vida e minimização das comorbidades decorrentes do TCE (MAAS et al., 2010). Atualmente, o tratamento padrão na abordagem inicial de um paciente traumatizado, que muitas vezes apresenta quadro de politraumatismo, deve seguir o padrão colocado pelo Colégio Americano de Cirurgiões, através do Suporte Avançado de Vida no Trauma (ATLS®) que recomenda, de imediato e nessa ordem, avaliar e resolver problemas concernentes à via aérea do paciente, à função ventilatória, cardiovascular, neurológica e após, expor e despir todo o corpo do paciente para avaliar possíveis danos não visualizados de imediato bem como sua proteção para evitar hipotermia. Durante esse procedimento, os problemas que

surtem em cada etapa realizada devem ser resolvidos, com a principal finalidade de manter o paciente vivo e estabilizado. Os pacientes que sobrevivem à esta etapa são submetidos a um exame físico minucioso, “dos pés à cabeça”, para que possam ser avaliadas possíveis lesões que, embora não as deixe instáveis, podem ser potencialmente danosas. Para complementar o exame secundário, os pacientes são posteriormente questionados quanto a alergias, medicamentos utilizados, possibilidade de gestação e história patológica pregressa, última vez que se alimentaram (para poder prever possíveis aspirações de conteúdo gástrico, por exemplo) e ambiente do trauma (para poder prever possíveis lesões internas e suas consequências) (SUPORTE AVANÇADO DE VIDA NO TRAUMA, 2004, p. 13-48).

No caso específico do TCE, os pacientes podem ou não serem submetidos à cirurgia, dependendo da presença e extensão de hemorragia, aumento da pressão intracraniana, desvio da linha média, fratura exposta do crânio, desalinhamento e fragmentação de ossos do crânio, entre outros (MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, p. 583). No caso da opção pelo tratamento conservador no paciente grave, primeiramente deve-se manter o paciente com forte analgesia, sedação e em ventilação mecânica, bem como possível aporte hemodinâmico. Objetiva-se nesse momento manter a pressão intracraniana controlada, medindo-a diretamente ou por controle clínico. Diversas são as medidas que tentam controlar a pressão intracraniana, sendo a mais efetiva a hiperventilação, que devido ao efeito de diminuição do CO₂, aumenta a vasoconstrição encefálica e assim, menos líquidos são extravasados para o parênquima cerebral. Ainda, pode-se fazer uso de agentes hiperosmolares como o manitol intravenoso ou proceder para a cirurgia de craniectomia descompressiva, que por retirar um fragmento da calota craniana, libera o parênquima a expandir-se para fora, liberando o encéfalo de uma pressão extremamente deletéria ao seu funcionamento (SUPORTE AVANÇADO DE VIDA NO TRAUMA, 2004, p. 191, MARTINS; DAMASCENO; AWADA, 2008, p. 583). Existem também evidências de que se as craniectomias forem ampliadas, possivelmente haja mais benefício para o tratamento do TCE (MAAS et al., 2010).

Diversas terapias farmacológicas foram propostas para o tratamento da lesão cerebral causada pelo TCE, sendo a corticoterapia uma das mais estudadas, porém, atualmente, sabe-se que não há benefício para traumas cerebrais tão pouco medulares com este tipo de abordagem (ALDERSON; ROBERTS, 2005; SAYER; KRONVALL; NILSSON, 2006). Conforme evidências recentes, as terapias farmacológicas vêm

perdendo o interesse da comunidade científica, visto que poucas conseguem chegar a estudos de fase III com algum sucesso e os tratamentos focados em estratégias terapêuticas, como a cirúrgica, vêm ganhando cada vez mais espaço conforme demonstra a Figura 1 (MAAS et al., 2010). Porém, poucos estudos clínicos ou pré-clínicos levam em consideração como desfecho o aparecimento de crises epilêpticas recorrentes, bem como sua suscetibilidade (MAAS et al., 2010; PITKANEN et al., 2009). Assim, não se sabe se melhoras clínicas gerais encontradas nos estudos sobre TCE podem influenciar na fase latente da EPT ou mesmo diminuir seu risco (PITKANEN et al., 2009).

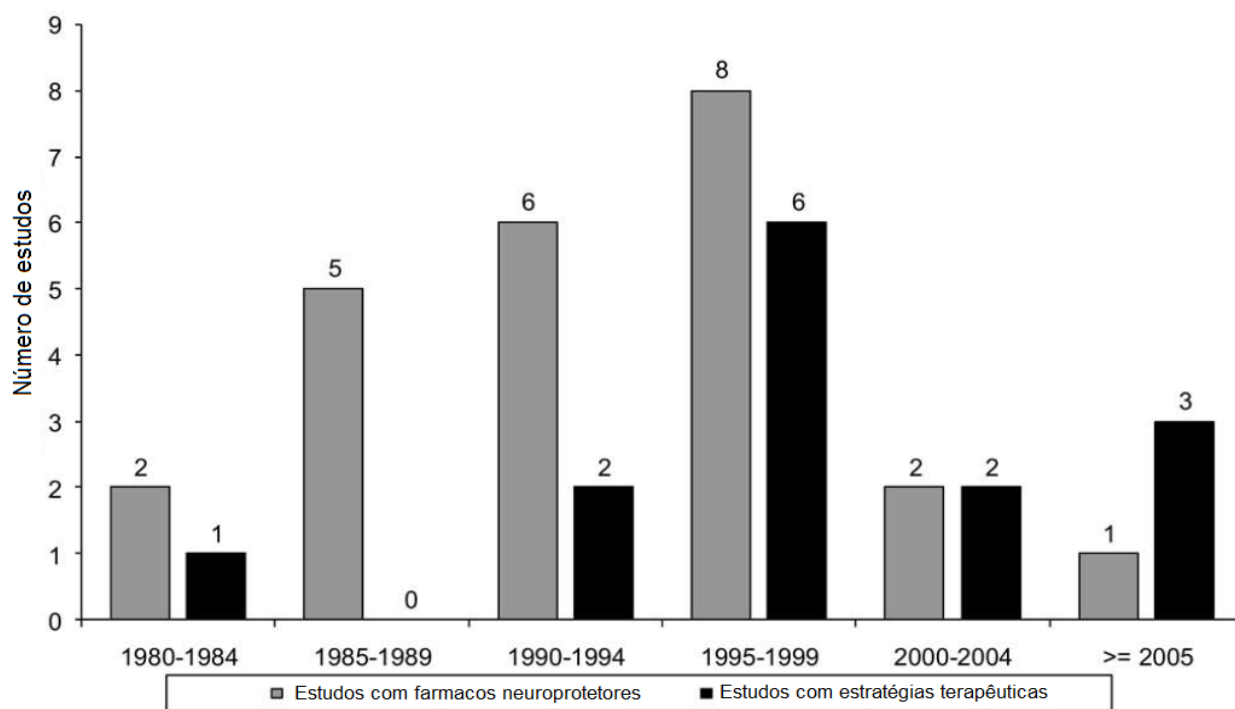


Figura 1 – Quantidade de testes clínicos randomizados iniciados com TCE moderado à grave com duração de cinco anos e sua relação com o tipo de terapia.

Testes clínicos agrupados em estudos que utilizaram agentes neuroprotetores e estratégias terapêuticas.
Fonte: MAAS et al. (2010).

1.2.2 Epilepsia pós traumática

A reorganização dos circuitos cerebrais, através dos processos originados pelas diferentes etapas do dano secundário ao TCE, leva a processos anômalos de reestruturação, ainda não totalmente elucidados e que em alguns casos, pode levar a crises epiléticas e, ao se tornarem recorrentes, configuram o quadro de EPT (LOWENSTEIN, 2009). Dessa forma, as crises epiléticas são definidas como a ocorrência transitória de sinais ou sintomas devidos a atividades paroxísticas hipersincrônicas anormais do tecido cerebral, e a epilepsia é caracterizada como uma desordem cerebral com uma duradoura predisposição a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas e psicológicas dessa condição. Ainda, a epilepsia necessita da ocorrência de pelo menos uma crise epilética (FISHER et al., 2005). Cerca de 10% das pessoas terão alguma crise epilética em algum momento da vida e cerca de 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia, sendo que 80% dessas estão em países em desenvolvimento (OMS, 2012) e 5% desses pacientes possuem epilepsia devido ao TCE (AGRAWAL et al., 2006).

As epilepsias são classificadas, de acordo com a origem e tipos de crise, em focais e generalizadas. Recentemente, uma nova terminologia foi proposta pela Liga Internacional Contra a Epilepsia, referindo que as crises denominadas focais iniciam em algum ponto da estrutura encefálica e se espalham em uma determinada ordem, recrutando circuitos cerebrais que oferecem uma determinada semiologia constante para cada crise epilética, podendo ou não se tornarem generalizadas. Já as generalizadas, muito provavelmente se originam em algum ponto, porém se espalham de maneira tão rápida pelo encéfalo que se tornam praticamente imperceptíveis sua distinção focal, acometendo rapidamente estruturas bilaterais e muitas vezes, não seguindo o mesmo padrão de difusão da atividade elétrica entre as crises (BERG et al., 2010).

Como particularidade do TCE, as crises epiléticas decorrentes desse evento são divididas entre imediatas (< 24 h), precoces (\leq 1 semana) e tardias (> 1 semana), devido aos diferentes mecanismos e consequências para a EPT (AGRAWAL et al., 2006; PITKANEN et al., 2009). A origem das crises imediatas e precoces parece ser diferente das tardias, pois, nas que ocorrem com menos de uma semana, a origem é atribuída à desequilíbrios funcionais provocados pelo próprio trauma, não sendo considerados fatores de risco importantes para a EPT (AGRAWAL et al., 2006). Já as crises tardias

configuram importante fator de risco para EPT e de fato, a presença dessas crises faz parte do diagnóstico dessa patologia (LOWENSTEIN, 2009; PITKANEN; MCINTOSH, 2006). O estudo do TCE como patologia geradora de epilepsia é fonte importante para o estudo da própria epilepsia, pois consiste em um insulto com início conhecido e o intervalo entre esse evento e o aparecimento das crises pode ser monitorado e estudado, principalmente nos modelos animais (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010). Assim, diversos fatores de risco relacionados ao trauma e às condições basais das vítimas ou modelos, foram relacionadas como agravantes para o desenvolvimento da EPT.

A gravidade do trauma é um fator de grande importância, sendo que vítimas de TCE leve possuem incidência cumulativa de 4,4%, o moderado de 7,6% e grave de 13,6% para desenvolver epilepsia. Ainda, outra forma de entender esses dados, o TCE leve aumenta em 2-4 vezes o risco de desenvolver epilepsia, enquanto a forma grave aumenta o risco em 7-30 vezes (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010; LOWENSTEIN, 2009). O risco de desenvolver EPT é maior nos primeiros dois anos após o evento traumático (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010), permanecendo alto até 20 anos (AGRAWAL et al., 2006) e a progressão da idade da vítima colabora para o aumento do risco, sendo significativamente mais alta em vítimas com mais de 15 anos de idade (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010). Além dos já citados, o tempo de inconsciência prolongado, hemorragias cerebrais, evacuações cirúrgicas do conteúdo craniano, amnésia maior que três dias, trauma por projéteis e desalinhamento de fragmentos ósseos do crânio são relacionados com aumento do risco para desenvolver EPT (AGRAWAL et al., 2006).

A EPT é possivelmente umas das epilepsias com maior potencial terapêutico, já que o momento da lesão é conhecido e o período latente que leva à suscetibilidade a crises recorrentes também pode ser medido e estudado (JENSEN, 2009; PITKANEN; LUKASIUK, 2011). No entanto, mesmo em estudos específicos para o propósito de prevenir o desenvolvimento de EPT, o sucesso na obtenção desse objetivo não foi atingido, incluindo estudos com fármacos antiepiléticos (TEMKIN, 2009) e terapias experimentais em modelos animais (KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010; PITKANEN et al., 2009). A carbamazepina e a fenitoína são fármacos que reduziram o aparecimento de crises epiléticas espontâneas precoces em pacientes, porém, essas, bem como o fenobarbital, ácido valpróico e magnésio, falharam em prevenir o aparecimento de crises epiléticas tardias (TEMKIN, 2009). Ainda, embora exista

grande desconexão entre os estudos em modelos animais e os estudos clínicos para traduzir os efeitos observados em laboratório em efeitos práticos, muito esforço tem sido realizado para padronizar os estudos clínicos, bem como identificar melhores biomarcadores prognósticos, a fim de assim, encontrar melhores candidatos à terapia (JENSEN, 2009; LOWENSTEIN, 2009; MAAS et al., 2012; PITKANEN et al., 2009).

1.2.3 Modelos experimentais de epilepsia pós traumática e suscetibilidade à convulsão

Devido às observações clínicas, criaram-se modelos que visam mimetizar as condições fisiopatológicas do TCE, com objetivos variados, tanto na compreensão da patologia quanto para estudo de terapias experimentais. Dentre os modelos de TCE, o mais utilizado para estudo da EPT é o de percussão de fluído, que é um modelo de TCE misto² (PITKANEN; MCINTOSH, 2006; THOMPSON et al., 2005). Descrito pela primeira vez em 1989 (MCINTOSH et al., 1989), foi testado em anos posteriores para a susceptibilidade a crises epiléticas induzidas (GOLARAI et al., 2001) e espontâneas (D'AMBROSIO et al., 2004; KHARATISHVILI et al., 2006), observando-se desenvolvimento de EPT em 43-92% dos animais estudados e com as crises espontâneas iniciadas entre duas e sete semanas após o trauma, sendo maior e mais precoce quando o TCE foi aplicado em animais com apenas 32-35 dias de vida (D'AMBROSIO et al., 2004; KHARATISHVILI et al., 2006). As diferenças das localizações das craniectomias para a colocação da cânula, a qual possibilita o acoplamento com o aparelho gerador do TCE nesses modelos experimentais, estão ilustradas na Figura 2.

Porém, poucos lugares no mundo possuem condições de monitoramento por longos períodos, para observar o surgimento de crises espontâneas. Nos modelos animais de TCE por lesão com percussão de fluído, foram observadas diversas alterações eletrofisiológicas que demonstram hiperexcitabilidade do tecido lesado, em períodos relativamente precoces e na fase latente da EPT, como 1-2 meses (THOMPSON et al., 2005). Os estudos que utilizaram pentilenotetrazol (PTZ)³ em

² TCE com lesão focal e difusa.

³ Antagonista não competitivo dos receptores GABA-A.

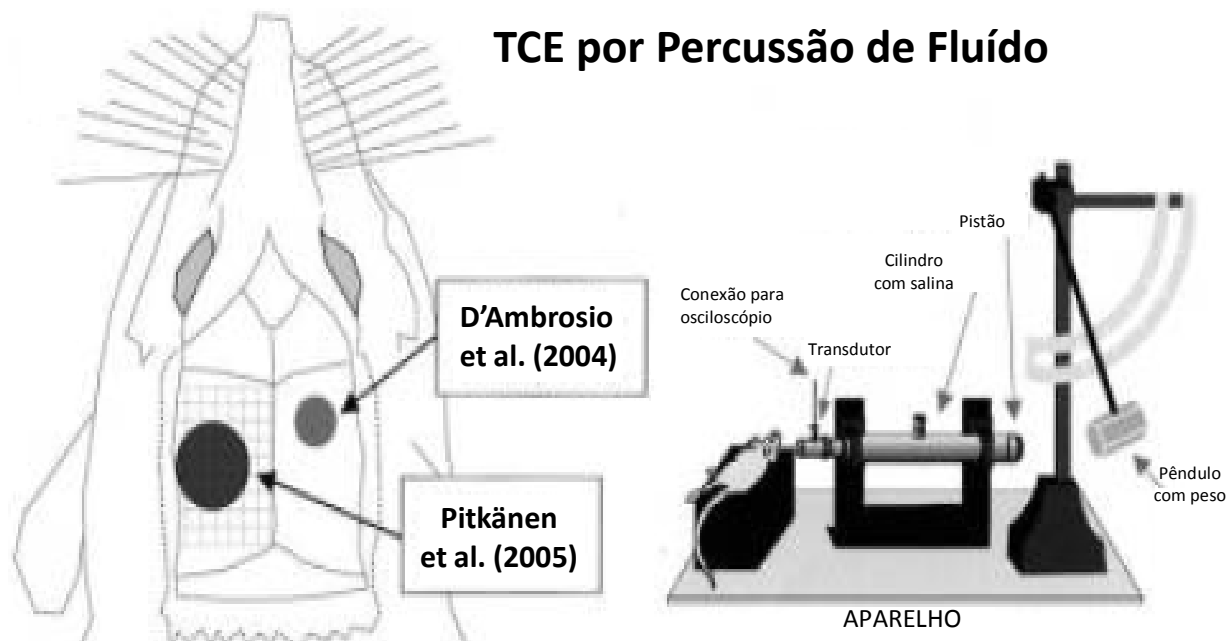


Figura 2 – Representação esquemática da localização de craniectomias e do aparelho gerador de TCE por percussão de fluido.

Fonte: PITKANEN; MCINTOSH (2006).

doses subconvulsivantes após o TCE iniciaram com testes em 15 semanas (GOLARAI et al., 2001), e até mesmo curtos como duas semanas após o trauma (BAO et al., 2011), revelando, nesse último, aumento da suscetibilidade às crises epiléticas causadas pelo TCE, bem como aumento dos danos no tecido cerebral lesionado realçado pelas crises induzidas. Esses estudos demonstraram que as crises epiléticas pós-traumáticas, especialmente aquelas que ocorrem uma semana após o TCE, agravaram os processos neurodegenerativos que conduzem à epilepsia (BAO et al., 2011; KHARATISHVILI; PITKANEN, 2010). Assim, não apenas a cura, mas também mudanças na frequência de crises, duração ou gravidade, são metas importantes a serem consideradas em estudos das epilepsias (PITKANEN; LUKASIUK, 2011).

Recentemente, um estudo prospectivo com duração de nove meses comparou o desenvolvimento de crises espontâneas e a suscetibilidade a crises epiléticas induzidas por PTZ, em seis e nove meses após o TCE, utilizando o modelo de percussão de fluido e de contusão cortical por impacto e concluiu que o modelo de suscetibilidade com PTZ é um bom preditor de crises espontâneas, podendo ser utilizado para levantar hipóteses

com relação à EPT (BOLKVADZE; PITKANEN, 2012). Ainda, embora o modelo de percussão de fluido possa provocar ambas crises epiléticas focais ou generalizadas (PITKANEN; MCINTOSH, 2006), assim como os pacientes vítimas de TCE (AGRAWAL et al., 2006), o PTZ tende a provocar crises generalizadas, já que inibe amplamente os receptores GABA-A, embora os registros antes da administração dessa droga demonstre atividade epileptiforme e espículas predominantemente no lado ipsilateral à lesão (BOLKVADZE; PITKANEN, 2012). Porém, as crises epiléticas espontâneas no modelo de percussão de fluido são em sua maioria secundariamente⁴ generalizadas (PITKANEN et al., 2009). De fato, demonstração recente com ressonância magnética funcional (informação verbal)⁵ evidencia que em animais com TCE, o PTZ não age de maneira uniforme, iniciando o aumento de atividade metabólica no córtex perilesional, propagando para o córtex contralateral e após, o tálamo contralateral e somente após esse evento que há evidência de aumento do metabolismo bilateral e homogêneo. Esses resultados não revelaram aumento da atividade hipocampal, embora se saiba da importância do hipocampo na gênese da EPT (discutido adiante), porém realçam a hipótese do envolvimento talâmico na propagação das crises, corroborando com dados de D'Ambrosio et al. (2004) que evidenciaram, entre 6-16 semanas pós-TCE, perdas neuronais e gliose no tálamo ipsilateral à lesão.

Tanto em modelos experimentais com camundongos e ratos, como em pacientes, foram observadas atividades elétricas registradas através de eletrodos no escalpo ou implantados, que demonstram áreas hiperexcitadas ou de irritação, principalmente no córtex cerebral, mas que podem ter origens em estruturas subcorticais (D'AMBROSIO et al., 2009; KHARATISHVILI et al., 2007; KHARATISHVILI et al., 2006). Em um estudo muito interessante, D'AMBROSIO et al. (2009) compararam quatro pacientes com epilepsia refratária e seu modelo animal de TCE, com registros periódicos da atividade elétrica do cérebro em ambos os grupos, utilizando técnica invasiva de eletrocortigografia (ECoG). Como achados principais, revelaram que atividades epiléticas ao registro de ECoG nos ratos eram muito semelhantes às encontradas nos pacientes e mesmo atividades curtas, como dois segundos, tinham correlação com eventos comportamentais antes despercebidos e que ao eletroencefalograma (EEG) eram imperceptíveis, tanto em ratos como nos pacientes analisados. Assim, concluíram

⁴ Essa expressão traduz que inicialmente, a crise epilética iniciou de maneira focal (BERG et al., 2010).

⁵ Palestra apresentada por Asla Pitkänen na VI Escola Latinoamericana de Epilepsia, Guarulhos, fevereiro de 2012.

que atividades elétricas focais anômalas de curta duração podem ser consideradas crises epilépticas e, mesmo que imperceptíveis nas análises não invasivas, foram relacionadas à origem da progressão do TCE para a EPT, na fase do dano secundário. Porém, já antes, análises de atividades epileptiformes⁶ eram utilizadas em modelo animal para inferir hiperexcitabilidade dos cérebros nos modelos de TCE, correlacionando com desenvolvimento de EPT (KHARATISHVILI et al., 2007; KHARATISHVILI et al., 2006). Atualmente, essas mensurações ainda são utilizadas, principalmente com a utilização do PTZ para baixar o limiar convulsivo e demonstrar a hiperexcitabilidade do cérebro após o TCE (BOLKVADZE; PITKANEN, 2012).

Em relação a estruturas mais profundas, como o tálamo, diversos achados de ritmos registrados no córtex foram caracterizados (BUZSAKI, 1991). O tálamo possui conexões com o córtex, conhecido como circuito tálamo-cortical, bem como com a região reticular de sua própria estrutura, conhecida como circuito reticulo-talâmico. Esses circuitos em especial funcionam em sincronia para produzir ondas em fusos que são registrados no tálamo e córtex, ocorrendo mais comumente nas fases iniciais do sono (CONTRERAS et al., 1997), bem como já foram encontradas em ratos velhos, relacionados à degeneração de neurônios colinérgicos do *nucleus basalis* (BUZSAKI et al., 1988). Para a geração de fusos sincrônicos e difusos, o córtex deve emitir uma atividade elétrica basal de baixa intensidade a qual, através de fibras cortico-talâmicas, estimula o surgimento dos fusos em diversas áreas do tálamo (CONTRERAS et al., 1997). Para a geração das ondas de fuso, são ainda necessárias conexões entre a região reticular do tálamo que exerce verdadeira função de marca-passo talâmico, originando as ondas de fuso registradas no córtex (BUZSAKI, 1991; FUENTEALBA; STERIADE, 2005). A região reticular recebe fibras excitatórias do córtex e tálamo, que por serem ativadas, exercem sua função inibitória com o ácido γ -aminobutírico (GABA) através de atividade elétrica com muitas espículas de alta frequência seguidas por atividade de fuso sobre o tálamo, sobre o qual começam a surgir potenciais inibitórios pós-sinápticos, hiperpolarizando suas células (BUZSAKI, 1991; FUENTEALBA; STERIADE, 2005), como demonstrado na Figura 3.

A atividade excitatória que o córtex exerce sobre a região reticular do tálamo pode ser uma das explicações da ausência de resposta ao estímulo externo durante crises

⁶ Atividade epileptiforme aqui definida como alteração eletroencefalográfica com traçado típico, com amplitude de onda duas vezes a do período basal e menor que cinco segundos (KHARATISHVILI et al., 2007).

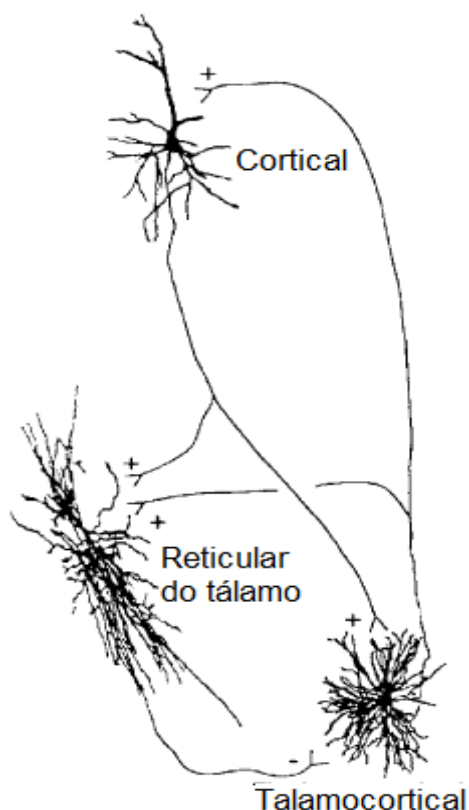


Figura 3 – Representação esquemática dos circuitos tálamo-corticais, reticulo-talâmicos e cortico-reticulares.

+, conexões excitatórias; -, conexões inibitórias. Fonte: FUENTEALBA; STERIADE (2005).

de ausência, já que a hiperestimulação sofrida pela região reticular tem a capacidade de inibir em excesso o tálamo, impedindo que os estímulos atinjam o córtex sensorial (FUENTEALBA; STERIADE, 2005; MACKENZIE; POPE; WILLOUGHBY, 2010). Além disso, MACKENZIE et al. (2010) demonstraram que as ondas de fuso, tanto fisiológicas como patológicas, são geradas por diversas regiões do cérebro e que esse tipo de atividade elétrica, por se difundirem rapidamente, sem padrão de dominância entre hemisférios cerebrais, são alterações súbitas de um mesmo fenômeno, no qual por um breve momento diversas regiões do cérebro sincronizam.

O tálamo não exerce suas funções excitatórias somente com o córtex, mas também com o hipocampo, através de conexões possivelmente monossinápticas, com a região do corno de Amon 1 (CA1), exercendo assim grande influência sobre a excitação e propagação de impulsos elétricos originados a partir dessa estrutura para o restante do cérebro (BERTRAM; ZHANG, 1999). Nesse sentido, o hipocampo tem sido descrito como um dos principais alvos relacionados com a origem da EPT, já que tanto em pacientes como em modelos animais, foi observada a degeneração dessa estrutura. De

fato, a esclerose hipocampal também é uma das características encontradas nos pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial e é associada a crises epiléticas nesses pacientes, com o TCE exercendo papel de insulto precipitante inicial para a EPT (D'AMBROSIO et al., 2005; GOLARAI et al., 2001; KHARATISHVILI et al., 2006; PITKANEN; MCINTOSH, 2006).

MAXWELL et al. (2003) observaram uma redução de células principais do hipocampo, entre 19 e 28% das regiões de CA1 e CA3 respectivamente, em pacientes que sobreviveram menos de uma semana ao TCE, e essas perdas aumentaram em pacientes que sobreviveram até seis meses, sugerindo dano progressivo dessa estrutura. Ainda, danos hipocampais são associados a 50-70% dos pacientes com EPT refratários à terapia antiepilética, demonstrando semelhança com relação à refratariedade à terapia nos pacientes com epilepsia do lobo temporal-mesial (MATHERN et al., 1994). Embora estudos com pacientes nessas condições sejam difíceis de serem feitos de maneira prospectiva, demonstrando apenas associação dos eventos nos estudos transversais, em modelos animais, essas alterações e relações causa-efeito são mais facilmente demonstradas. Nesse sentido, no caso do TCE por modelo de percussão de fluido, essa relação causa-efeito pode ser mais facilmente avaliada. Já foi demonstrado hiperexcitabilidade das células granulares do giro dentado e na região CA1 do hipocampo, bem como perdas de interneurônios hilares inibitórios e proliferação de fibras musgosas (KHARATISHVILI et al., 2006; PITKANEN; MCINTOSH, 2006), porém sem alterações patológicas significativas no hipocampo nos estágios precoces da lesão provocada pelo TCE, esta se concentrando de maneira perilesional (D'AMBROSIO et al., 2004), semelhante aos achados em pacientes (MAXWELL et al., 2003). Por outro lado, sabe-se que o hipocampo, córtex e o tálamo não são as únicas estruturas que sofrem dano secundário ao TCE, o qual ocorre também no tronco encefálico, cerebelo, lobo frontal ventro-medial, entre outras estruturas. Também pouco se sabe se especificamente essas alterações se diferenciam entre as vítimas de TCE que desenvolvem ou não EPT (PITKANEN; MCINTOSH, 2006).

Recentemente, porém, diferenças entre animais que sofreram TCE e desenvolveram ou não EPT, foram relatadas com relação ao sistema GABAérgico do hipocampo. Nesse estudo, KHARLAMOV et al. (2011) relataram que em todos os animais com TCE houve diminuição da expressão da subunidade γ_2 , responsável pela

inibição fásica⁷, porém, somente nos animais que não desenvolveram ETP, houve aumento importante da expressão de subunidade δ dos receptores GABA-A, responsáveis pela atividade inibitória tônica⁸. Assim, concluem que essas diferenças podem ter relação com um alvo proteico específico, que estaria associado à possibilidade de desenvolver ou não a EPT, bem como sugerem essas proteínas como alvo terapêutico. Mais tarde no mesmo ano, outros pesquisadores (PAVLOV et al., 2011), avaliaram as diferenças funcionais com relação à expressão de receptores GABA-A e correntes inibitórias tônicas e fásicas no hipocampo de animais que sofreram TCE em modelo que sabidamente desenvolve EPT. Nesse estudo, observou-se a diminuição das correntes fásicas em um e seis meses após o TCE, bem como diminuição do total de neurônios GABAérgicos, principalmente no giro dentado e região hilar no hipocampo ipsilateral à lesão, progredindo para o hipocampo contralateral em seis meses. Porém, não foi observada alteração na expressão de diversas subunidades de receptores GABA-A, mantendo a funcionalidade da inibição tônica, essa, porém, insuficiente para responder às alterações provocadas por estímulos excitatórios. Devido à progressão das alterações, os autores propuseram que a janela terapêutica poderia ser estendida além dos momentos iniciais do TCE, ao menos se o alvo terapêutico for o sistema GABAérgico (PAVLOV et al., 2011). Como conclusão desses trabalhos, observa-se que as alterações plásticas do sistema GABAérgico são progressivas após o TCE, podem levar à EPT e são sugeridas como alvo terapêutico.

1.2.4 Creatina

Diversos compostos foram e continuam sendo testados na busca por agentes que atuem sobre o sistema nervoso central, para modificar processos patológicos subsequentes ao traumatismo e entre eles está a creatina (ácido 2-metil guanidinoacético). A creatina é um composto ergogênico obtido através da dieta e produzido a partir da glicina, arginina e metionina pelos rins, pâncreas e cérebro, através

⁷ A inibição fásica é exercida na sinapse de maneira transitória, respondem rapidamente às alterações excitatórias e são mediadas principalmente pela subunidade γ_2 dos receptores GABA-A (FARRANT; NUSSER, 2005).

⁸ A inibição tônica é exercida longe da sinapse de maneira contínua e sem flutuações e são mediadas principalmente pela subunidade δ dos receptores GABA-A (FARRANT; NUSSER, 2005).

de processos enzimáticos envolvendo a glicina-amidino transferase e a guanidinoacetato-metiltransferase, sendo importante para a manutenção das funções celulares (BRAISSANT, 2012; WALLIMANN; TOKARSKA-SCHLATTNER; SCHLATTNER, 2011). Se administrada via oral, possui Vd em torno de 49,4 L, *clearance* de 42,6 L/h, é totalmente absorvida pelo intestino, possui $t_{1/2}$ de degradação para creatinina em pH estomacal e intestinal de 55 e 40 dias respectivamente, e possui $t_{1/2}$ de eliminação de 1-3 horas. Porém, por saturar e diminuir sua absorção por seus transportadores e ser acumulada nas células, é ingerida apenas uma vez ao dia se o objetivo for seu uso continuado (DELDICQUE et al., 2008). Em pessoas adultas, 5 g de creatina atingem um pico plasmático de 120 mg/L em uma hora sendo eliminada na forma de creatinina pelos rins (MCCALL; PERSKY, 2007). Em ratos, a creatina injetada via intraperitoneal atinge um pico plasmático de creatina+fosfocreatina de 0,8 mM em 30 minutos e concentração cerebral de 50 μ M em cerca de duas horas, permanecendo estável em 60 μ M por até nove horas. No entanto, a diferença que o acréscimo da creatina suplementada exerce na concentração cerebral total é inexpressiva (PERASSO et al., 2003) ou muito pequena, cerca de 5-10%, mesmo após um mês de suplementação em seres humanos (DECHENT et al., 1999), pois o cérebro, assim como os músculos esquelético e cardíaco, já possui concentrações basais altas de creatina, incrementando pouco com a suplementação crônica (IPSIROGLU et al., 2001).

A creatina obtida pela dieta entra no cérebro a partir de transportadores pertencentes à família de carreadores de soluto 6 (SLC6A8) (BRAISSANT, 2012), semelhante a que transporta dopamina, GABA, serotonina, glicina, prolina e taurina (DELDICQUE et al., 2008). O *K_m* dos transportadores é de 45,5 μ M e seu *V_{max}* é de 1719 pmol de creatina/min/mg de proteína, diminuindo cerca de 2,4 vezes se as células que contém os transportadores forem expostas à creatina por 24 horas (DODD et al., 2010), o que talvez explique seu efeito de saturação com doses repetidas (DELDICQUE et al., 2008). Para a entrada nos tecidos, são necessários dois Na⁺ e um Cl⁻, havendo o co-transporte com a creatina (MAK et al., 2009). Em ratos, os transportadores de creatina existem em alta expressão em estruturas como o córtex, tálamo e hipocampo, bem como bulbo olfatório, colículo superior, cerebelo e núcleo do nervo facial, conforme demonstra a Figura 4.

Convenientemente, pode-se observar que o córtex, tálamo e hipocampo, que contem grande expressão dessas proteínas que transportam a creatina para o interior das

células, são as mesmas que possuem alterações patológicas do TCE que podem levar à suscetibilidade à crises epilépticas, como relatado anteriormente.

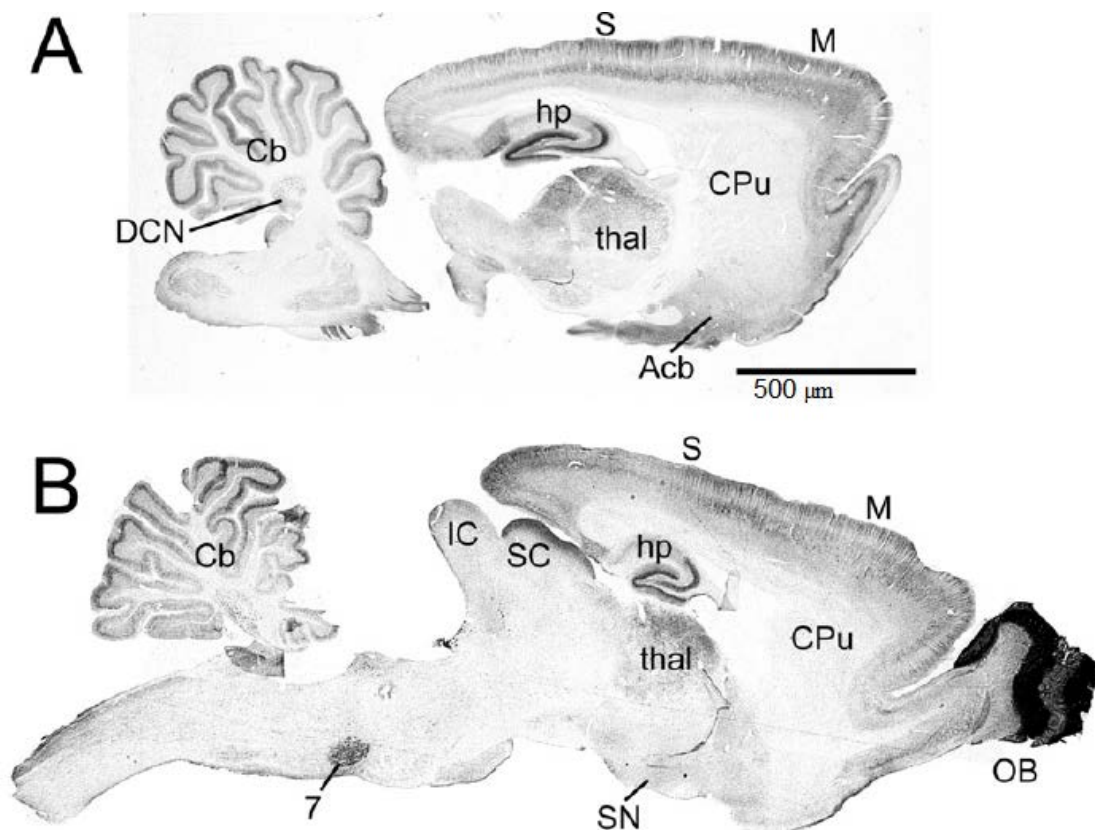


Figura 4 – Expressão de transportadores de creatina no cérebro de rato.

A, porção lateral; B, porção medial. M, córtex motor; S, córtex sensorial; CPu, putamen; hp, hipocampo; thal, tálamo; Acb, *nucleus accumbens*; Cb, cerebelo; DCN, núcleo cerebelar profundo; IC, colículo inferior; SC, colículo superior; 7, núcleo do nervo facial; SN, substância negra; OB, bulbo olfatório. Fonte: MAK et al. (2009).

Os efeitos mais conhecidos da creatina são os da sua participação, através da creatinoquinase (CK), na formação da fosfocreatina (PCr), sistema importante para repor fosfatos de alta energia à adenosina difosfato (ADP) na restauração da adenosina trifosfato (ATP) e assim, contribuir para a formação de um tampão energético (WALLIMANN et al., 2011). A forma mitocondrial da CK esta localizada na membrana externa das mesmas e ancora diversas proteínas que, em situações tanto fisiológicas quanto patológicas, contribui para tais eventos, através da abertura de poros de transição mitocondrial (PATERGNANI et al., 2011). Esses poros geram liberação

transitória e fugaz de prótons para o meio externo juntamente com a cadeia transportadora de elétrons em situações fisiológicas, ou diminuição do potencial de membrana mitocondrial, disfunção da produção de energia, estresse oxidativo e sinalização para apoptose ou necrose celular em situações patológicas (PATERGNANI et al., 2011). Um grupamento fosfato é agregado à creatina, através da CK mitocondrial, que gera PCr e nesse processo pode haver estabilização dessa enzima, a qual inibe a formação de poros de transição mitocôndrias e diminuem a geração de espécies reativas de oxigênio, além de gerar a própria PCr que, no citosol, libera o grupo fosfato para o ADP, através de reação exercida pela CK citosólica, conectando os sítios de produção com os sítios de consumo do ATP (WALLIMANN et al., 2011). De maneira aplicada à crises epilépticas, estudo recente demonstrou que a creatina administrada de forma aguda protege da diminuição do potencial de membrana mitocondrial, causada pelas convulsões induzidas por PTZ em ratos e assim, protege da diminuição dos níveis de ATP e ADP e do aumento de marcadores de estresse oxidativo, atenuando por fim, as crises convulsivas (RAMBO et al., 2012). De forma semelhante, foi demonstrado que a creatina protege de convulsões de acidemia metilmalônica e glutárica, em modelos animais dessas patologias (MAGNI et al., 2007; ROYES et al., 2003; ROYES et al., 2006)

Também já foi demonstrado que a creatina é liberada por exocitose (dependente do potencial de ação) por neurônios do hipocampo (ALMEIDA et al., 2006), bem como exerce atividade ansiolítica semelhante aos benzodiazepínicos em galinhas (KOGA et al., 2005) e diminui a concentração de glutamato no líquido de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ATASSI et al., 2010). Em outro estudo, utilizando técnicas de eletrofisiologia, *binding* e antagonismo farmacológico, a creatina aumentou a ligação do antagonista MK801⁹ e foi associada ao aumento da atividade neuronal da região de CA1 do hipocampo, o qual foi revertido utilizando antagonista de receptores NMDA, revelando um papel modulatório nesses receptores excitatórios no hipocampo (ROYES et al., 2008). Assim, conclui-se que a creatina tenha um papel neuromodulador ou neurotransmissor fisiológico do sistema nervoso (BRAISSANT, 2012), embora não haja definição quanto a sua atividade excitatória ou inibitória.

⁹ MK801 é um antagonista dos receptores NMDA que se liga no mesmo apenas quando esse está aberto, portanto, quando sua ligação está aumentada, refere que é maior a probabilidade de se encontrar esse receptor com seu canal aberto ou ativado (VANDAME et al., 2007).

Resultados recentes mostram que a creatina possui efeitos protetores em doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Parkinson e Huntington, assim como é sugerido que este composto possui especial ação contra neurodegeneração (GUALANO et al., 2010). Com relação ao TCE, SULLIVAN et al. (2000) demonstraram que ratos suplementados com creatina previamente ao trauma possuíam perdas neuronais 50% menores, sete dias após o TCE, bem como apresentaram diminuição de marcadores de estresse oxidativo. Testes piloto em pacientes pediátricos vítimas de TCE foram realizados por SAKELLARIS e colaboradores (SAKELLARIS et al., 2006; SAKELLARIS et al., 2008), sendo demonstrado melhora em testes cognitivos, percepção da dor, tontura, fadiga, entre outras disfunções neurológicas, nos pacientes suplementados com creatina 400 mg/kg/dia por seis meses.

Em estudos com ratos Wistar saudáveis, este composto, administrado por cinco semanas, reduziu as crises epiléticas provocadas por dose convulsivante (60 mg/kg) de PTZ (RAMBO et al., 2009). Em cultura de células de medula espinhal humana, a creatina aumentou a imunoreatividade aos receptores GABA-A nos neurônios, sugerindo um aspecto modulador de expressão gênica por esse composto no tecido nervoso em desenvolvimento (DUCRAY et al., 2007). Esses dados se tornam relevantes, já que as epilepsias são consideradas um conjunto de doenças crônico-degenerativas e uma das abordagens terapêuticas é o aumento da neurotransmissão GABAérgica (BERG et al., 2010; GLAUSER et al., 2006) e, em especial, após o TCE, pode haver alteração na expressão de subunidades de receptores GABA-A, com implicações funcionais para o tecido cerebral (KHARLAMOV et al., 2011; PAVLOV et al., 2011), tornando essa propriedade da creatina potencialmente aplicável.

1.3 Justificativa

O estudo sobre tratamentos tardios no TCE se torna de vital importância em todo o mundo, pois é uma patologia de incidência global e muitos estudos que propuseram tratamentos precoces não demonstraram resultados satisfatórios. Por isso, torna-se interessante avaliar intervenções em outras fases dessa patologia, principalmente com recursos de menor custo e baixa tecnologia, como, talvez, a utilização da creatina. Devido às evidências e a importância de um tratamento mais adequado, considera-se necessário avaliar a hipótese de que a creatina possa ter algum efeito no início da fase tardia do dano iniciado pelo TCE, a qual pode dar início à fase latente do desenvolvimento de EPT. A creatina, que apresenta potenciais benefícios em patologias do sistema nervoso central e possui alta expressão de seus transportadores em regiões do cérebro envolvidas no processo de suscetibilidade a crises convulsivas pós-traumáticas, torna-se muito atraente como candidato a testes em estudos com TCE.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Verificar se a suplementação de creatina modifica os parâmetros de susceptibilidade à crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol (PTZ), após o traumatismo cranioencefálico (TCE) em ratos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação de creatina, por um mês e dose única, no tempo de latência, duração e intensidade das crises epilépticas, bem como, nas alterações eletroencefalográficas induzidas pelo PTZ após o TCE em ratos.
- Avaliar se o possível efeito anticonvulsivante da suplementação da creatina, por um mês, persiste quando suspensa por uma semana após esse período.
- Avaliar o risco relativo de os ratos suplementados com creatina apresentarem crises epilépticas após o TCE.

2 ARTIGO

2.1 Artigo



Creatine protects against late seizure susceptibility in traumatic brain injured rats: A novel therapeutic window

Journal:	<i>Epilepsia</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full length original research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hoffmann, Maurício; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Silva, Luiz Fernando Almeida; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química Rambo, Leonardo; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química Ribeiro, Leandro; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química Della-Pace, Iuri; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Stamm, Daniel; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas Royes, Luiz Fernando Freire; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas Fighera, Michele Rechia; Universidade Federal de Santa Maria, Neuropsiquiatria
Key Words:	Fluid Percussion Injury, Epilepsy, EEG, Epileptiform Discharge, Spindle

**Creatine protects against late seizure susceptibility in traumatic brain injured rats: A
novel therapeutic window**

Maurício S. Hoffmann^{1,3}, Luiz F. de A. Silva^{2,3}, Leonardo M. Rambo^{2,3}, Leandro R. Ribeiro^{2,3},
Iuri D. Della-Pace^{2,3}, Daniel N. Stamm³, Luiz F. F. Royes^{1,2,3}, Michele R. Fighera^{1,2,3,*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Centro de Ciências da Saúde.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

Centro de Ciências Naturais e Exatas.

³Laboratório de Bioquímica do Exercício.

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Running Title: Creatine reduces seizure after TBI.

Key Words: Fluid Percussion Injury, Epilepsy, EEG, Epileptiform Discharge, Spindle.

Number of pages: 26

Number of words: 4494

Number and proposed size of figures: Figures 1, 2, and 3, 1/4 journal page each; figure 4, one page; supplementary figure 1, 1/8 page.

Number and proposed size of tables: Table 1, 1/2 journal page; supplementary table 1, 1/3 journal page.

*Corresponding author: Michele Rechia Fighera, MD, PhD

Departamento Neuropsiquiatria,

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

FAX: +55 55 3220 8031

e-mail: mrfighera@yahoo.com.br

Summary and key words:

Purpose: Traumatic brain injury (TBI) is an acute event that can lead to increased seizure susceptibility and epilepsy. Several studies in patients and animal models try to minimize the damage caused by TBI with early interventions, however, many patients are unable to receive early medical attention and no therapy has proved effective to date. Creatine (Cr) is essential for the maintenance of several cell functions and has also been shown useful in neurologic dysfunctions, including seizures. However, the benefits of Cr treatment for seizure susceptibility after TBI are still shrouded in controversy. In this study, we investigated the effect of chronic and acute Cr supplementation after TBI in rats, testing seizure susceptibility after subconvulsant dose of pentylenetetrazol (PTZ).

Methods: Adult male Wistar rats were supplemented with Cr (300 mg/kg; p.o.) in three different ways. First, Cr was administered one week after TBI for four weeks until to PTZ test (35 mg/kg, i.p.), when behavioral and electroencephalographic records were performed. In the second, the same protocol was applied, with the exception that Cr supplementation was suspended for one week until to PTZ test, to assess whether Cr effect requires continued use. In the third, five weeks after TBI, Cr was administered two hours before PTZ test, to evaluate the acute effect of Cr.

Key findings: We found that chronic Cr supplementation increased the latency to first myoclonic and tonic-clonic seizures, and decreased time spent in tonic-clonic seizure, epileptiform discharges and spindle oscillation, even if supplementation is discontinued for one week. This effect was not observed if TBI group was supplemented only once, except basal spindle oscillation, which have been narrowed in this form of administration.

Significance: This study brings new approaches to the understanding of seizures after traumatic brain injury: (1) therapeutic window for TBI can be extended and not be limited to few minutes after injury; (2) Cr can be a therapeutic adjuvant in the processes that leads to seizure

susceptibility; (3) spindle oscillation was found increased in TBI rats and associated with epileptiform discharge.

Key Words: Fluid Percussion Injury, Epilepsy, EEG, Epileptiform Discharge, Spindle.

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a common disorder in all societies and cause many disabilities, including seizures (De Silva et al., 2009; Kharatishvili & Pitkanen, 2010). Regarding posttraumatic epilepsy (PTE), early seizures reflect the severity of the injury itself, whereas the late seizures result from maturation of epileptogenic pathology (Pitkanen & McIntosh, 2006). On the other hand, post-traumatic seizures may aggravate the neurodegenerative processes that lead to PTE, especially those that occur one week after TBI (late seizures) (Kharatishvili & Pitkanen, 2010; Bao et al., 2011). In this context, several studies have demonstrated that higher levels of inflammatory substances, cerebral edema and neuronal death in perilesional area that happen in the first week after TBI (Immonen et al., 2009; Cederberg & Siesjo, 2010; Lescot et al., 2010) are followed by remodeling of the brain in a latent period with aberrant circuitry that leads to epilepsy (Kharatishvili & Pitkanen, 2010; Pitkanen & Lukasiuk, 2011). Accordingly, the progression of neuronal damage during the first 1-2 months post-injury corresponds to period when most of the electrophysiology alterations implying increased excitability of injured tissue (Thompson et al., 2005). In this sense, the frequency, duration and severity of seizures are important targets that can be investigated in studies of epileptogenesis after TBI (Pitkanen & Lukasiuk, 2011).

Although studies in the trauma field provide a large amount of information about the molecular alternations corresponding to the early phases and acute treatment, as soon as 15 minutes after injury (Maas et al., 2010), chronic studies to the epileptogenesis phase are spare (Pitkanen et al., 2009). In addition, several patients do not have the immediate access to medical care (De Silva et al., 2009), thus significant resources are required to develop a better understanding of the pathophysiologic mechanism as targets for potential prophylactic therapies.

In order to find a neuroprotective agent that can act as a disease-modifying or antiepileptogenic (Pitkanen et al., 2009), experimental data have demonstrated that dietary creatine (Cr) supplementation affords significant neuroprotection against TBI (Sullivan et al., 2000).

Creatine ($C_4H_9O_2N_3$; methyl-guanidine-acetic acid) is an endogenous guanidine compound which exogenous supplementation has been widely used as an ergogenic aid by athletes and also eventual practitioner of physical activity (Braissant et al., 2001; Andres et al., 2008). It is vital for maintain of the energetic buffer of ATP thru the formation of phosphocreatine, but there is also evidence that have a antioxidant and pleiotropic proprieties (Wallimann et al., 2011). In children and adolescents victims of TBI treated with Cr (400 mg/kg; p.o.) beginning four hours after admission and taken daily for six months, had good recovery in cognition, headache, time spent in intensive care unit (Sakellaris et al., 2006; Sakellaris et al., 2008). Furthermore, experimental findings have demonstrated that a standard rodent diet enhanced with 1% Cr monohydrate attenuates the extent of cortical damage (Sullivan et al., 2000) and protects against the accumulation of lactic acid and free fatty acids (FFA), markers of secondary cellular injury in standardized model of cortical contusion (Scheff & Dhillon, 2004). On the other hand, recent experimental data from our group have demonstrated that early Cr administration protected against TBI-induced oxidative damage, however had no effect on convulsive parameters induced by subeffective dose of PTZ four days after neuronal injury (Saraiva et al., 2012). This lack of consistent anticonvulsant effect exerted by Cr in this early phase suggests that its apparent antioxidant effect does not protect against excitatory input generation elicited by TBI.

Therefore, considering that significant resources are required to develop a better understanding of pathologic mechanism and there are caveats to consider when interpreting the

effect of Cr supplementation after TBI, our objective is to evaluate the impact of delayed supplementation (after one week) of Cr in TBI rats, testing its susceptibility to seizure with subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg i.p.) after five weeks of neuronal injury.

Materials and Methods

Animals and reagents

In the present study 90-day old male Wistar rats were used. Animals were kept under controlled laboratory conditions (12:12 h light-dark cycle, lights on at 07:00 a.m.; $24 \pm 1^\circ\text{C}$; 55% relative humidity) with free access to water and food (Supra; Santa Maria, RS, Brasil). Room temperature for the experiments was $25.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee. All protocols were design with the goal to keep the number of animals to a minimum, as well as their suffering. PTZ, carboxymethylcellulose (CMC) and creatine were purchased from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.) and PTZ was prepared in 0.9% NaCl sterile solution.

Study design

This study consists in three independent experiments. In all experiments, animals (N = 116) were submitted to the surgery procedure as described below, being divided randomly as sham or TBI animals. In Supplementary Figure 1, a schematic diagram of the experimental procedures is presented.

In experiment 1 (Exp1), seven days after TBI procedure, animals were randomly reassigned to receive Cr supplementation (300 mg/kg, p.o.), suspended in 0.5% CMC or vehicle (CMC) (Sakellaris, et al. 2006; Magni et al., 2007; Rambo et al., 2009) for four weeks. In the third week

of Cr supplementation, animals were submitted to electroencephalographic (EEG) surgery as described below. One week after surgery procedure, animals were injected with a subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.). Experiment 2 (Exp2) was design to determine whether the possible anticonvulsant effect exerted by Cr would be maintained. For this, the protocol was the same as in Exp1, with the exception that Cr was suspended for seven days after the supplementation period. After one week, animals were injected with PTZ (35 mg/kg, i.p.). In order to determine the acute effect of Cr on susceptibility to seizure, five weeks after TBI an subset of animals received Cr or vehicle (CMC) two hours before the PTZ test, which consisted in experiment 3 (Exp3).

Traumatic brain injury procedure and severity analysis

TBI was carried out as described previously with little modifications (D'Ambrosio et al., 2009). Animals were anesthetized with a single Equithesin injection (3 ml/kg, i.p.; 1% sodium pentobarbital, 4% chloral hydrate, 2% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, 11.2% absolute ethanol) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. A burr hole of 3.5 mm in diameter was drilled on the right convexity, 2 mm posterior to the bregma and 3 mm lateral to the midline, taking care to keep the dura mater intact. A plastic injury cannula was placed over the craniotomy with dental cement. When the dental cement hardened, the cannula was filled with chloramphenicol, closed with a proper plastic cap. Immediately, the animal was removed from the stereotaxic device and returned to its homecage. After 24 hours, the animals were anesthetized with isoflurane 1%, and had the injury cannula attached to the fluid percussion device and placed in a heatpad maintained at 37 ± 0.2 °C.

TBI was produced by a fluid-percussion device developed in our laboratory. A brief (15–20 ms) transient pressure fluid pulse impact was applied (Supplementary Table 1) against the

exposed dura. Pressure pulses were measured extracranially by a transducer (Fluid Control Automação Hidráulica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and recorded on a storage oscilloscope (Gould Ltd., Essex, UK). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of the fluid percussion injury. Immediately after these procedures, the cannula was removed and the orifice was covered with dental cement.

The mortality rate after TBI was quantified and time to restore righting reflex was registered from surviving animals as an index of severity (Thompson et al., 2005). After assumed this position, they were submitted in a circular open field test, as a parameter of exploring behavior in the acute moment after trauma (O'Connor et al., 2003; Thompson et al., 2005). Briefly, the rats were placed in the center of a round space of 0.5 m high by 1 m in diameter, with the floor marked with 12 curved quadrilaterals and a center circle of equivalent areas. The number of times that the areas was crossed (crossing) and they stay just in both hindlimbs (rearing) were quantified for five minutes. After each test, the open field was cleaned with 30% ethanol.

EEG recording and behavioral analysis

After four (Exp1 and Exp3) and five weeks (Exp 2) neuronal injury, animals were anesthetized with Equitesin and surgically implanted with electrodes under stereotaxic guidance. Two screw electrodes was placed over the right and left parietal cortexes, 3 mm lateral and 4 mm posterior to bregma, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to the multipin socket and were fixed to the skull with dental acrylic cement.

One week later, animals were allowed to settle for habituation in a Plexiglas cage (25 x 25 x 60 cm) for at least one hour. Baseline electroencephalographic (EEG) recordings were obtained 10 min prior to PTZ injection in order to establish an adequate control brain electrical activity and for 20 min after that. To determine whether the seizure threshold was reduced after TBI and

detect any enhance seizure susceptibility, we used a single subconvulsant dose of 35 mg/kg of body weight (i.p.) of PTZ, appropriate and tested for Wistar rats (Maciejak et al., 2010), since this method have been used to correlate seizure susceptibility to post-traumatic epilepsy (Bolkvadze & Pitkanen, 2012). EEG was recorded using digital encephalographic equipment (Neuromap EQSA260, Neuromap LTDA, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 250 Hz) and stored in a PC for off-line analysis.

The behavioral analysis was carried out blindly by two of the researchers, registering the time to first myoclonic seizure, to first generalized tonic-clonic seizure and duration of generalized tonic-clonic seizure. Modified Racine scale was performed as follows: 1 = twitching, freezing; 2 = myoclonic jerks of one forelimb; 3 = bilateral forelimb clonus; 4 = forelimb clonus with rearing; 5 = tonic-clonic convulsion (Racine, 1972; Kharatishvili et al., 2007). EEG recordings were visually analyzed for the appearance of seizure activity, defined as a > 5 s duration of high amplitude rhythmic discharge with a clear onset, temporal evolution in wave morphology, amplitude and offset (Kharatishvili et al., 2007). Also, we quantified the total number of epileptiform discharges (ED) since it has been demonstrated to be reliable long term indicator of increased seizure susceptibility, defined as a high-amplitude (twice the baseline) rhythmic discharge containing a burst of slow waves, spike wave and/or polyspike-wave components and lasting < 5 s (Kharatishvili et al., 2007; D'Ambrosio et al., 2009). During the experiment, several spindle activities were detected in the monitor, with no behavioral modification observed by the two researchers. Rhythmic scratching of the electrode headset by the animal rarely caused artifacts. These recordings were easily identified and discarded.

Risk analysis to develop PTZ-induced tonic-clonic seizure.

In order to analyze whether Cr has any effect on the appearance of generalized tonic-clonic

seizure induced by PTZ test described above, we classified the animals who suffered TBI in a two by two contingency table in the following categories: Exposed or not to Cr and with or without generalized tonic-clonic seizure. TBI animals were analyzed by experiment and pooled from all experiments (evaluating the overall exposure to Cr).

Statistical analysis

To evaluate the normality of the data, we applied the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Non Normal data (latency to first myoclonic seizures, tonic-clonic, generalized seizure duration and Racine scale) were evaluated with the Scheirer-Ray-Hare test. ED and spindle oscillations before PTZ test were evaluated by the two-way analysis of variance (two-way ANOVA) and a repeated measure (RM) analysis was used to evaluate the ED and spindles after PTZ injection, since they were dependent on the previous period. Bonferroni test comparing all groups was applied to *post hoc* analysis. Pearson correlation test was used to analyze the relationship between ED and spindle oscillations. Two-sided Fisher's exact test was applied for categorical data analysis, with relative risk and 95% confidence interval (CI) calculated to assess whether use of Cr modified susceptibility to generalized tonic-clonic seizures in animals who have suffered TBI. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

TBI severity

Overall mortality after TBI was 14.65% (17 animals from 116) and 14 of these animals died before restoring the righting reflex, presenting pulmonary edema and nasal bloody mucus discharge. Another three died within 24 h of injury. Adding these data with those obtained by open-field test and the pressure applied by the device (Supplementary Table 1), we conclude that it was produced a moderate TBI (Thompson et al., 2005).

Latency to first myoclonic and tonic-clonic seizures

Analysis of latency to first myoclonic and tonic-clonic seizures revealed a significant interaction between Cr and TBI in the four weeks supplementation protocol (Exp1) for myoclonic ($H_1 = 4.124$; $p < 0.05$; Fig. 1A) and tonic-clonic seizures ($H_1 = 8.159$; $p < 0.01$; Fig. 1B). This anticonvulsant effect characterized by myoclonic ($H_1 = 5.918$; $p < 0.01$; Fig. 2A) and tonic-clonic latency increase ($H_1 = 6.142$; $p < 0.05$; Fig. 2B) persisted one week after the end of Cr supplementation. On the other, statistical analysis revealed that five weeks after TBI (Exp3), only the effect of sham/TBI procedures was significant for latency to first myoclonic ($H_1 = 5.608$; $p < 0.05$; Fig. 3A) and tonic-clonic seizures ($H_1 = 7.295$; $p < 0.01$; Fig. 3B). Acute Cr administration had no effect on the first myoclonic and tonic-clonic seizures induced by subeffective dose of PTZ (Fig. 3 A-B).

Duration of tonic-clonic seizure and Racine scale

In Exp1, statistical analysis shown that Cr reduced the time spent in generalized tonic-clonic seizure in TBI animals after PTZ injection ($H_1 = 8.159$; $p < 0.01$; Fig. 1C).

Supplementation with Cr also reduced seizure as observed in Racine's scale ($H_1 = 8.357$; $p < 0.01$; Fig. 1D). In Exp2, Cr supplementation also reduced the duration of tonic-clonic seizure ($H_1 = 6.142$; $p < 0.05$; Fig. 2C) and seizures measured in Racine's scale ($H_1 = 7.811$; $p < 0.01$; Fig. 2D) in the TBI animals after PTZ injection. In Exp3, only sham/TBI effect was significant to explain the differences in time spent in tonic-clonic seizure ($H_1 = 8.791$; $p < 0.01$; Fig. 3B) and Racine's scale ($H_1 = 5.069$; $p < 0.05$; Fig. 3D). Figures 1E, 2E and 3E show representative EEG traces, chosen based on the medians of the measures described above.

Epileptiform discharges

Figure 4 A-C display quantification of ED. No differences were found in all experiments regarding the baseline record (Basal, Fig 4A-C). After PTZ test, it was found a significant interaction between sham/TBI procedures and CMC/Cr supplementation in Exp1 ($F_{3,28} = 8.034$; $p < 0.001$; Fig. 4A) and Exp2 ($F_{3,37} = 6.376$; $p < 0.01$; Fig. 4B), but not in Exp3 (Fig. 4C). *Post-hoc* analysis revealed a reduction of ED in TBI animals treated with Cr supplementation in Exp1 and Exp2 (Figures 4A and 4B). In Exp3, *post-hoc* analysis revealed only TBI effect on the ED increase ($F_{1,25} = 3.863$; $p < 0.05$; Fig. 4C). A significant effect of time was also found in the RM-ANOVA analysis between Basal and PTZ periods in Exp1 ($F_{1,28} = 49.08$; $p < 0.0001$; Fig. 4A), Exp2 ($F_{1,37} = 35.39$; $p < 0.0001$; Fig. 4B) and Exp3 ($F_{1,25} = 43.83$; $p < 0.0001$; Fig. 4C), revealing the effect of PTZ injection in the appearance of ED.

Spindle oscillation

During the experiments, spindle oscillations were detected without behavioral alterations. Spindle oscillations were quantified based on EEG records. Before PTZ test, a significant interaction were observed between sham/TBI procedures and CMC/Cr supplementation in Exp1

($F_{1,28} = 4.501$; $p < 0.05$; Fig. 4G), Exp2 ($F_{1,37} = 4.718$; $p < 0.05$; Fig. 4H) and Exp3 ($F_{1,25} = 4.281$; $p < 0.05$; Fig. 4I), with post-hoc analysis indicating that Cr reduces the appearance of these oscillations at baseline, even if administered just once (Basal, Fig. 4I). After PTZ test, it was also found a significant interaction between sham/TBI procedures and CMC/Cr supplementation in Exp1 ($F_{3,28} = 3.47$; $p < 0.05$; Fig. 4G) and Exp2 ($F_{3,37} = 3.906$; $p < 0.05$; Fig. 4H) and *post-hoc* analysis showed a reduction of spindle oscillations in TBI animals caused by Cr in both experiments. This effect was not observed in Exp3 (Fig. 4I), with *post-hoc* analysis revealing only TBI effect to explain the increased spindle oscillations ($F_{1,25} = 4.155$; $p < 0.05$; Fig. 4I). A significant effect of time was also found between Basal and Post PTZ periods in Exp1 ($F_{1,28} = 37.50$; $p < 0.0001$; Fig. 4G), Exp2 ($F_{1,37} = 44.41$; $p < 0.0001$; Fig. 4H) and Exp3 ($F_{1,25} = 52.43$; $p < 0.0001$; Fig. 4I) revealing the effect of PTZ injection in spindle oscillations. In addition, a positive correlation was found between spindles and ED ($F_{1,98} = 60.0$; $p < 0.0001$, Fig. 4E) in the sum of all animals in all experiments.

Risk of PTZ-induced tonic-clonic seizure in TBI

Taken together all forms of supplementation protocol, Cr protected against tonic-clonic seizure induced by PTZ. Analyzing each experiment, Cr supplementation for four weeks (Exp1), even if suspended for one week (Exp2), had the same effect. When Cr was administered acutely (Exp3), the protective effect was not observed, as shown in Table 1.

Discussion

In the present study we demonstrated for the first time so far, that Cr supplementation after moderate TBI has a mitigating effect on susceptibility to seizures induced by subconvulsant dose of PTZ, an effect that persists even if Cr is discontinued for seven days. Furthermore, the results presented in this report showed that acute Cr administration did not protect against EEG and behavioral seizures induced by subeffective dose of PTZ.

Another important objective of this study was to evaluate if a later therapeutic window would be effective, since there is evidence that this is possible in epileptogenesis (Pitkanen & Lukasiuk, 2011). In line of this view, there are studies using this therapeutic strategy in TBI, with periods ranging from 24 to 14 days (Meng et al., 2011; Moro et al., 2011), however, none used seizure as an outcome. Thus, our experimental data suggest that it is possible to have a larger intervention period to improve seizure susceptibility in TBI since Cr supplementation one week after moderate TBI protected against the seizures induced by subeffective dose of PTZ.

Over the last decade, several evidences have shown that Cr has neuromodulatory properties from *in vitro* to randomized, double-blind, placebo-controlled trials for neurodegenerative diseases (Andres et al., 2008; Gualano et al., 2010; Wallimann et al., 2011). In this context, clinical studies have demonstrated that the administration of Cr to children with TBI improved results in several parameters, including duration of post-traumatic amnesia, duration of intubation, intensive care unit stay, disability, good recovery, self-care, communication, locomotion, sociability and cognitive function (Sakelaris et al., 2006; Sakelaris et al., 2008). Moreover, studies in animal model of TBI have demonstrated that Cr supplementation reduces TBI-related cortical tissue damage through mechanism involving maintenance of mitochondrial bioenergetics and preservation of ATP levels (Sullivan et al.,

2000). Accordingly, Cr-enriched diet can provide substantial neuroprotection, in part by suppressing the accumulation of FFAs. Considering that FFAs and lactate are markers of secondary injury processes and related to mitochondrial integrity, the mechanism by which Cr affords neuroprotection may be through a direct action on the mitochondrial homeostasis (Scheff & Dhillon, 2004), however, in this study, this can only be speculated.

In line of this view, data from experimental models of seizures show that Cr has effect against seizures in organic acidemias, characterized by mitochondrial dysfunction, oxidative stress generation and secondary excitotoxicity (Royes et al., 2003; Magni et al., 2007; Royes et al., 2008). Recently, Rambo et al. (2009) have demonstrated that chronic supplementation with Cr improved seizure parameters in a fully convulsant dose of PTZ (Magni et al., 2007; Rambo et al., 2009). As in those studies, Cr supplementation also increased latency to first myoclonic and tonic-clonic seizure in Exp1 and Exp2. In addition, Cr supplementation decreased time spent in tonic-clonic seizure and score on Racine's scale in both chronic protocols of the present study (Exp1 and Exp2), but not if acutely administered (Exp3), suggesting that Cr need to be supplemented in a chronic way, to normalize the latency to seizures and reduce their severity.

It is important to considerer that improve seizure parameters elicited by Cr may already be important in the study of epilepsy (Pitkanen & Lukasiuk, 2011). In this context, our data revealed that Cr supplementation reduced the risk for induced tonic-clonic seizures in TBI rats in the sum of all protocols. In addition, if analyzed separately, only chronic supplementation protocols (Exp1 and Exp2) were protective against PTZ-induced tonic-clonic seizures. Analytically similar, other studies have demonstrated reduced seizure susceptibility using proconvulsant drug testing or observing spontaneous seizures, few weeks after TBI, demonstrating their therapeutic strategies effectiveness (Atkins et al., 2010; Kharatishvili & Pitkanen, 2010; Eastman et al., 2011; Pitkanen & Lukasiuk, 2011). Thus, the protective effect found in this report resemble studies with classic

antiepileptic drugs in patients to prevent early seizures, which do not show as effective a week after trauma (Temkin, 2009). Although it is widely used, seizure susceptibility to PTZ is not as precise as to observe spontaneous seizure itself for evaluation of post-traumatic epilepsy. Thus, we cannot conclude that creatine is effective to prevent post-traumatic epilepsy, only susceptibility to seizures.

The results presented in this report also showed that TBI induced spindle oscillations. The spindle oscillations are generated mainly by the reticular nucleus of the thalamus and it is implicated in the inhibition of thalamocortical system during cortically generated seizures (Fuentelba & Steriade, 2005). Considering that spindling activity can be alterations during which many brain regions briefly synchronize (Mackenzie et al., 2010) it is plausible to propose the involvement of the thalamus in the development of this pathology. In addition, Pearson's correlation analysis revealed a positive correlation between spindles and ED after PTZ injection. However, since deep electrodes was not implanted to investigate specific regions of thalamus, this explanation remains speculative in nature, and further studies are necessary to determine the mechanisms involved.

Not only spindle oscillations, but also EDs were reduced by Cr supplementation for four weeks, even if suspended for seven days. Furthermore, although Cr has not decreased seizure susceptibility, it decreases basal spindle oscillations in the acute administration (Exp3). Considering that ED has been associated with post-traumatic epilepsy (Kharatishvili et al., 2007; Bolkvadze & Pitkanen, 2012) and spindle oscillations are generated during cortically generated seizures (Fuentelba & Steriade, 2005) it is plausible to propose that reduction of these EEG recordings elicited by Cr protects against hyperexcitability induced by TBI.

In summary, the results presented in this report revealed that Cr supplementation beginning one week after TBI reduced seizure susceptibility induced by subconvulsant challenge

of PTZ, an effect that persists one week after Cr deprivation. These experimental data reveal good therapeutic window and suggest a possibility to expand the therapeutic opportunity in a way that approximates to the real victims of TBI. Furthermore, specific EEG recordings modulated by Cr provides a framework to guide further understanding of seizure susceptibility and studies to examine the mechanisms by which Cr alters neuronal functions. Hence, this data suggest that this guanidine compound may be a new therapeutic approach to control late seizure susceptibility after TBI.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Mauro S. Oliveira and Carlos F. de Mello for sharing their expertise and knowledge on modeling seizure and TBI. Work supported by CNPq/FAPERGS (grants: Pronem 11/2082-4) and CAPES. L.F.A. da Silva, L.M. Rambo, L.R. Ribeiro, M.R. Figuera and L.F.F. Royes are recipients of CNPq fellowships. M.S. Hoffmann is recipient of FAPERGS fellowship.

Disclosure

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

Figure legends:

Figure 1: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment 1. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with Sham–Vehicle, Sham–Creatine and TBI–Creatine (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 8-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylenetetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of tonic-clonic seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

Figure 2: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment 2. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with Sham–Vehicle, Sham–Creatine and TBI–Creatine (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 8-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylenetetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of tonic-clonic seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

Figure 3: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment 3. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared

with sham groups (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 7-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylenetetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of generalized seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

Figure 4: Effect of oral creatine supplementation in epileptiform discharges (defined in the text, represented in D) and spindle oscillations (represented in F) in all experiments. Data from Experiment 1 (A and G), Experiment 2 (B and H) and Experiment 3 (C and I). # $p < 0.0001$ compared Basal and Post-PTZ periods. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared TBI-Vehicle with all other groups in the respective time period (Two-way RM ANOVA and Bonferroni tests). (E) Significant correlation ($r = 0.61$, $p < 0.0001$) between epileptiform discharges and spindle oscillations in the sum of all experiments. Basal, 10 minute electroencephalographic recordings 2 h after the last/only supplementation of creatine in Exp1/Exp3 and one week after the creatine discontinuation in Exp2; Post-PTZ, 20 minutes electroencephalographic recordings after PTZ 35 mg/kg i.p. excluding ictal and postictal activities; TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose; PTZ, pentylenetetrazol; CxL, left parietal cortex; CxR, right parietal cortex.

Supplementary Figure 1: Schematic diagram of experimental procedures. In experiment 1 (Exp1) and 2 (Exp2), creatine supplementation was started one week (w) after traumatic brain injury (TBI) and maintained for four weeks. In experiment 3 (Exp3) creatine was administered only once at the end of the fifth week after TBI. At the end of the fourth week, the animals in Exp1

and Exp3 underwent stereotactic surgery for placement of recording electrodes for electroencephalogram (EEG surg.) and the animals of the Exp2, at the end of the fifth week. Pentylentetrazol (PTZ) test was performed 2 h after the last creatine gavage in Exp1 and Exp3, and one week after discontinuation of creatine in Exp2.

References:

Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343.

Atkins CM, Truettner JS, Lotocki G, Sanchez-Molano J, Kang Y, Alonso OF, Sick TJ, Dietrich WD, Bramlett HM. (2010) Post-traumatic seizure susceptibility is attenuated by hypothermia therapy. *Eur J Neurosci* 32:1912-1920.

Bao YH, Bramlett HM, Atkins CM, Truettner JS, Lotocki G, Alonso OF, Dietrich WD. (2011) Post-traumatic seizures exacerbate histopathological damage after fluid-percussion brain injury. *J Neurotrauma* 28:35-42.

Bolkvadze T, Pitkanen A. (2012) Development of post-traumatic epilepsy after controlled cortical impact and lateral fluid-percussion-induced brain injury in the mouse. *J Neurotrauma* 29:789-812.

Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C. (2001) Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 86:193-201.

Cederberg D, Siesjo P. (2010) What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst* 26:221-226.

D'Ambrosio R, Hakimian S, Stewart T, Verley DR, Fender JS, Eastman CL, Sheerin AH, Gupta P, Diaz-Arrastia R, Ojemann J, Miller JW. (2009) Functional definition of seizure provides new insight into post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 132:2805-2821.

De Silva MJ, Roberts I, Perel P, Edwards P, Kenward MG, Fernandes J, Shakur H, Patel V (2009) Patient outcome after traumatic brain injury in high-, middle- and low-income countries: analysis of data on 8927 patients in 46 countries, *Int J Epidemiol* Published online: Apr 2009;doi:dyn189 [pii] 10.1093/ije/dyn189

Eastman CL, Verley DR, Fender JS, Stewart TH, Nov E, Curia G, D'Ambrosio R. (2011) Antiepileptic and antiepileptogenic performance of carisbamate after head injury in the rat: blind and randomized studies.

J Pharmacol Exp Ther 336:779-790.

Fuentealba P, Steriade M. (2005) The reticular nucleus revisited: intrinsic and network properties of a thalamic pacemaker. *Prog Neurobiol* 75:125-141.

Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. (2010) Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* 38:31-44.

Immonen RJ, Kharatishvili I, Niskanen JP, Grohn H, Pitkanen A, Grohn OH. (2009) Distinct MRI pattern in lesional and perilesional area after traumatic brain injury in rat--11 months follow-up. *Exp Neurol* 215:29-40.

Kharatishvili I, Immonen R, Grohn O, Pitkanen A. (2007) Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 130:3155-3168.

Kharatishvili I, Pitkanen A. (2010) Posttraumatic epilepsy. *Curr Opin Neurol* 23:183-188.

Lescot T, Fulla-Oller L, Po C, Chen XR, Puybasset L, Gillet B, Plotkine M, Meric P, Marchand-Leroux C. (2010) Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27:85-94.

Maas AI, Roozenbeek B, Manley GT. (2010) Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. *Neurotherapeutics* 7:115-126.

Maciejak P, Szyndler J, Turzynska D, Sobolewska A, Bidzinski A, Kolosowska K, Plaznik A. (2010) Time course of changes in the concentrations of amino acids in the brain structures of pentylenetetrazole-kindled rats. *Brain Res* 1342:150-159.

Mackenzie L, Pope KJ, Willoughby JO. (2010) EEG spindles in the rat: evidence for a synchronous network phenomenon. *Epilepsy Res* 89:194-206.

Magni DV, Oliveira MS, Furian AF, Fiorenza NG, Figuera MR, Ferreira J, Mello CF, Royes LF. (2007) Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res* 1185:336-345.

Meng Y, Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Qu C, Chopp M. (2011) Dose-dependent neurorestorative effects

of delayed treatment of traumatic brain injury with recombinant human erythropoietin in rats. *J Neurosurg* 115:550-560.

Moro N, Ghavim SS, Hovda DA, Sutton RL. (2011) Delayed sodium pyruvate treatment improves working memory following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 491:158-162.

O'Connor C, Heath DL, Cernak I, Nimmo AJ, Vink R. (2003) Effects of daily versus weekly testing and pre-training on the assessment of neurologic impairment following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 20:985-993.

Pitkanen A, Immonen RJ, Grohn OH, Kharatishvili I. (2009) From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia* 50 Suppl 2:21-29.

Pitkanen A, Lukasiuk K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 10:173-186.

Pitkanen A, McIntosh TK. (2006) Animal models of post-traumatic epilepsy. *J Neurotrauma* 23:241-261.

Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.

Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, Silva LF, Retamoso LT, Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, Mello CF, Royes LF. (2009) Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 55:333-340.

Sakellaris G, Kotsiou M, Tamiolaki M, Kalostos G, Tsapaki E, Spanaki M, Spilioti M, Charissis G, Evangeliou A. (2006) Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. *J Trauma* 61:322-329.

Sakellaris G, Nasis G, Kotsiou M, Tamiolaki M, Charissis G, Evangeliou A. (2008) Prevention of traumatic headache, dizziness and fatigue with creatine administration. A pilot study. *Acta Paediatr* 97:31-34.

- Saraiva AL, Ferreira AP, Silva LF, Hoffmann MS, Dutra FD, Furian AF, Oliveira MS, Figuera MR, Royes LF. (2012) Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. *Brain Res Bull* 87:180-186.
- Scheff SW, Dhillon HS. (2004) Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. *Neurochem Res* 29:469-479.
- Sullivan PG, Geiger JD, Mattson MP, Scheff SW. (2000) Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol* 48:723-729.
- Temkin NR. (2009) Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 50 Suppl 2:10-13.
- Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. (2005) Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma* 22:42-75.
- Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. (2011) The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40:1271-1296.

Supplementary table 1. Behavioral and biometrical data

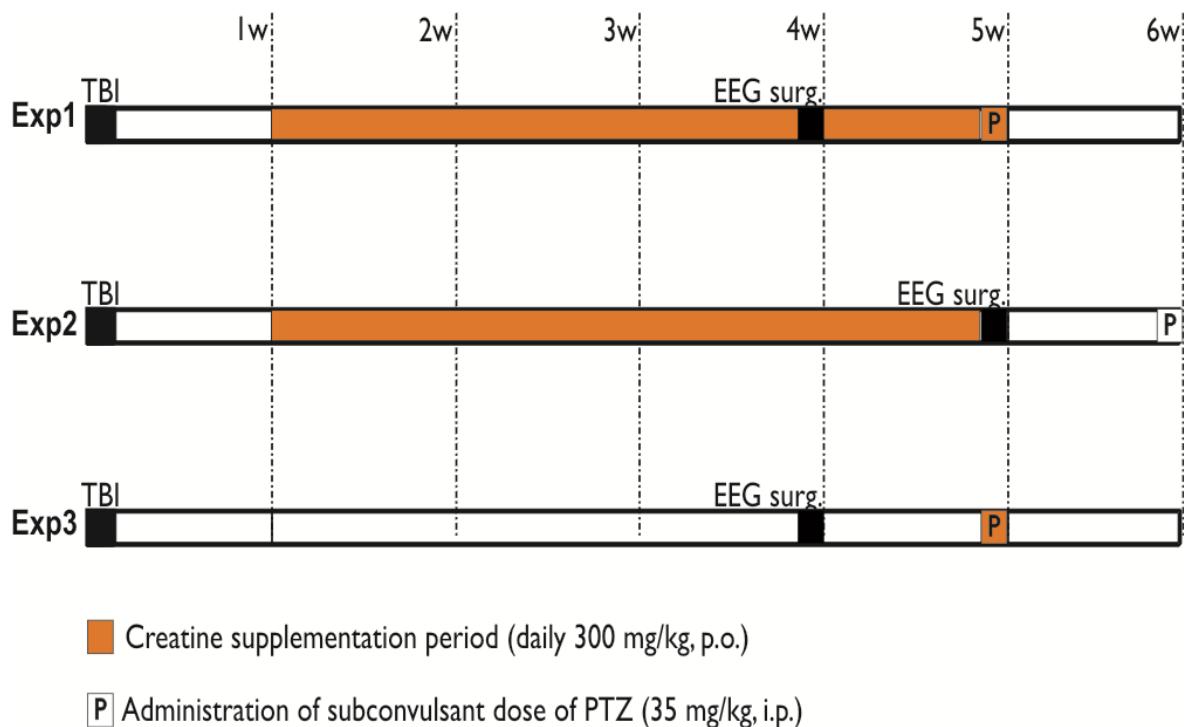
Variable	Sham–CMC	Sham–Cr	TBI–CMC	TBI–Cr
Baseline weight (g)	270.1 ± 6.34	273.5 ± 8.57	283.4 ± 6.53	282.0 ± 6.45
Righting position time (s)	74.77 ± 11.68	68.33 ± 11.35	353.6 ± 34.06*	329.4 ± 33.51*
Pressure applied (atm)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.80 ± 0.12 [#]	3.76 ± 0.10 [#]
Rearing	9.86 ± 0.38	9.14 ± 0.43	1.22 ± 0.25 [§]	1.50 ± 0.39 [§]
Crossing	63.23 ± 3.14	55.33 ± 2.75	12.39 ± 2.63 [‡]	10.29 ± 2.87 [‡]

Baseline weight did not differ from each group, analyzed retrospectively. Righting position time, pressure applied, rearing and crossing was not different between TBI groups, but were from sham groups. Data are mean ± S.E.M. for n = 23–28 in each group, including all experiments. * $F_{3,96} = 34.28, p < 0.001$; # $F_{3,113} = 605.5, p < 0.001$; § $F_{3,96} = 163.2, p < 0.001$; ‡ $F_{3,96} = 95.46, p < 0.001$, comparing with sham groups. CMC, Carboximetilcelulose; Cr, Creatine; TBI, Traumatic brain injured rats.

Table 1. Effect of creatine in the relative risk of PTZ-induced tonic-clonic seizure in TBI

		TBI			Sham		
		n	TC seizure	RR (95% CI)	n	TC seizure	RR (95% CI)
Exp 1	Creatine	9	1	0.11 (0.02–0.70) <i>p</i> < 0.001	8	0	
	Vehicle	8	8		8	0	
Exp 2	Creatine	9	1	0.14 (0.02–0.93) <i>p</i> < 0.05	8	0	
	Vehicle	9	7		8	0	
Exp 3	Creatine	9	4	0.64 (0.31–1.31) <i>p</i> = 0.35	8	0	
	Vehicle	8	6		7	0	
All Experiments	Creatine	27	6	0.32 (0.16–0.63) <i>p</i> < 0.001	24	0	
	Vehicle	25	21		23	0	

Data from EEG and behavioral analysis after administered subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.) revealing the relative risk for develop tonic-clonic seizure after creatine supplementation. Since none of the Sham animals had tonic-clonic seizure, the test could not be performed in this group (Fisher's exact test). TBI, Traumatic brain injured rats; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose; TC, tonic-clonic; Exp 1, experiment 1; Exp 2, experiment 2; Exp 3, experiment 3; RR, relative risk; CI, Confidence interval.



Supplementary Figure 1: Schematic diagram of experimental procedures. In experiment 1 (Exp1) and 2 (Exp2), creatine supplementation was started one week (w) after traumatic brain injury (TBI) and maintained for four weeks. In experiment 3 (Exp3) creatine was administered only once at the end of the fifth week after TBI. At the end of the fourth week, the animals in Exp1 and Exp3 underwent stereotactic surgery for placement of recording electrodes for electroencephalogram (EEG surg.) and the animals of the Exp2, at the end of the fifth week. Pentylentetrazol (PTZ) test was performed 2 h after the last creatine gavage in Exp1 and Exp3, and one week after discontinuation of creatine in Exp2.

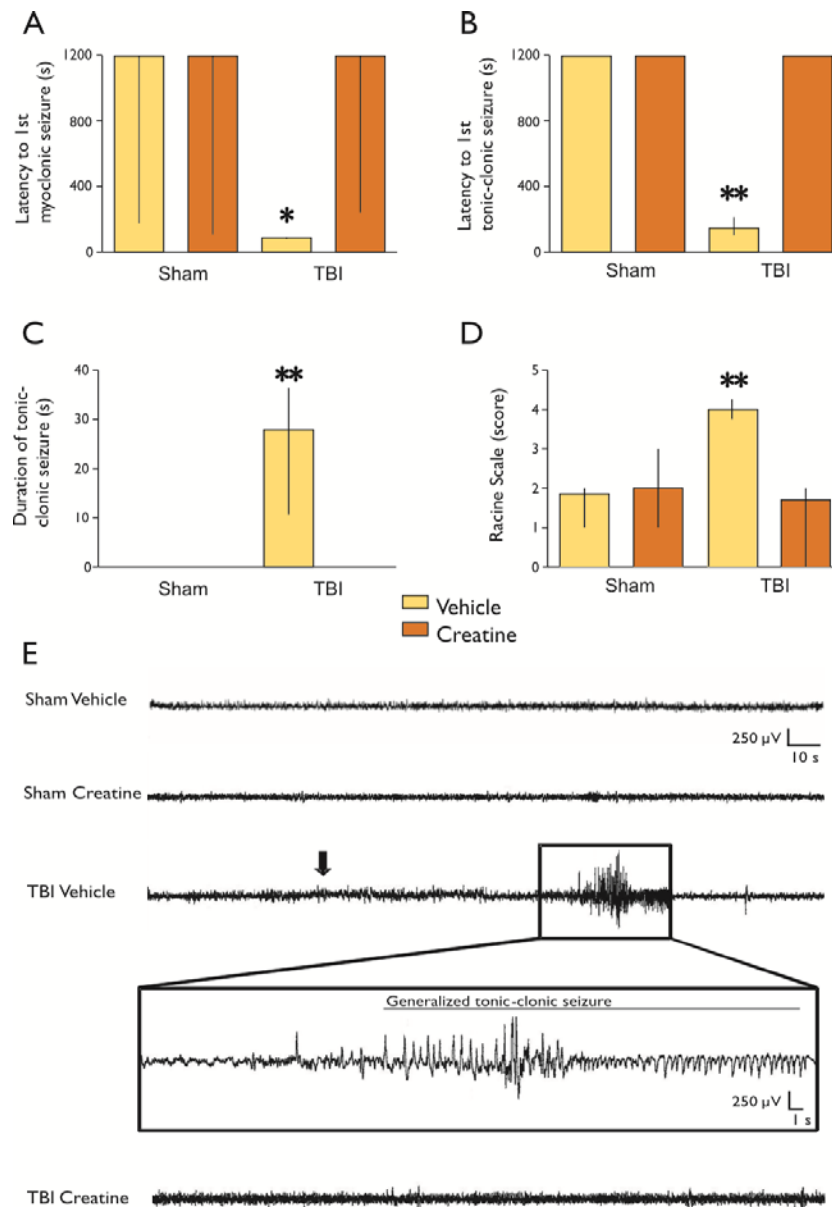


Figure 1: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment I. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with Sham–Vehicle, Sham–Creatine and TBI–Creatine (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 8-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylentetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of tonic-clonic seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

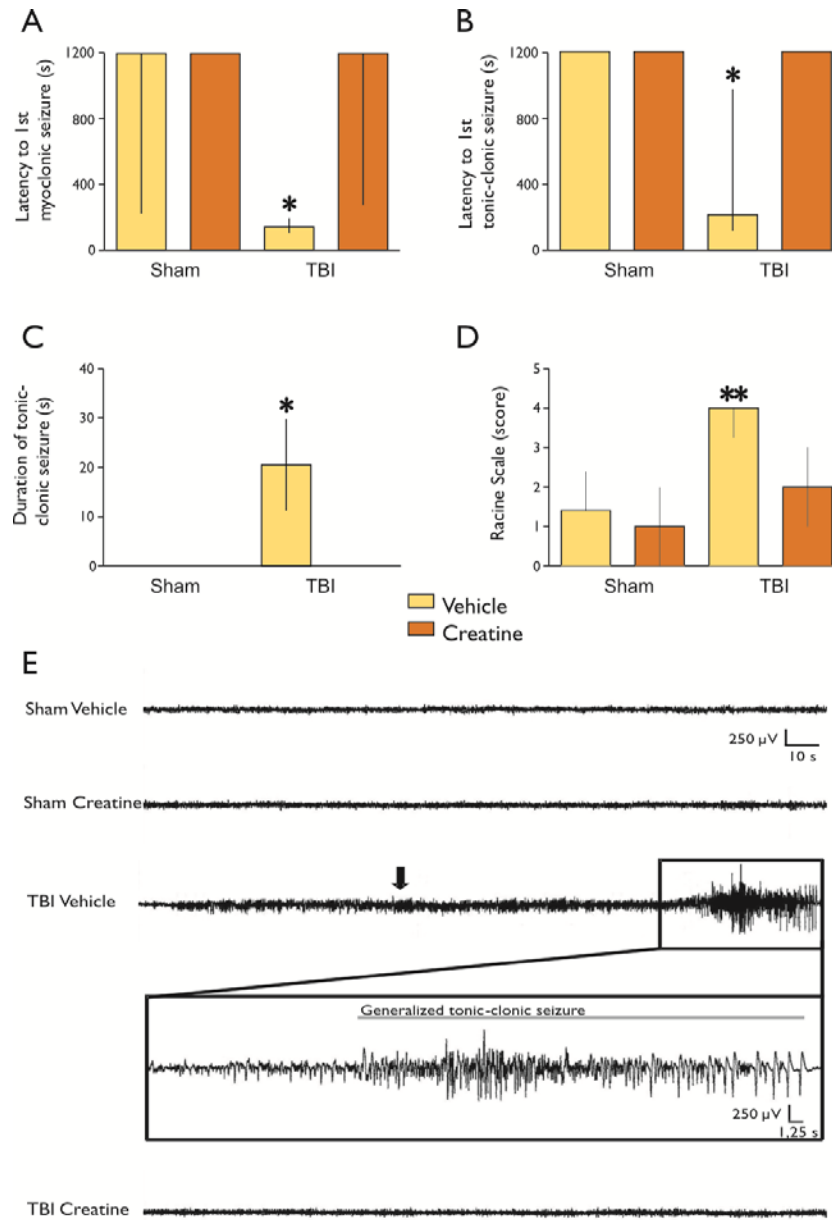


Figure 2: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment 2. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with Sham–Vehicle, Sham–Creatine and TBI–Creatine (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 8-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylenetetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of tonic-clonic seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

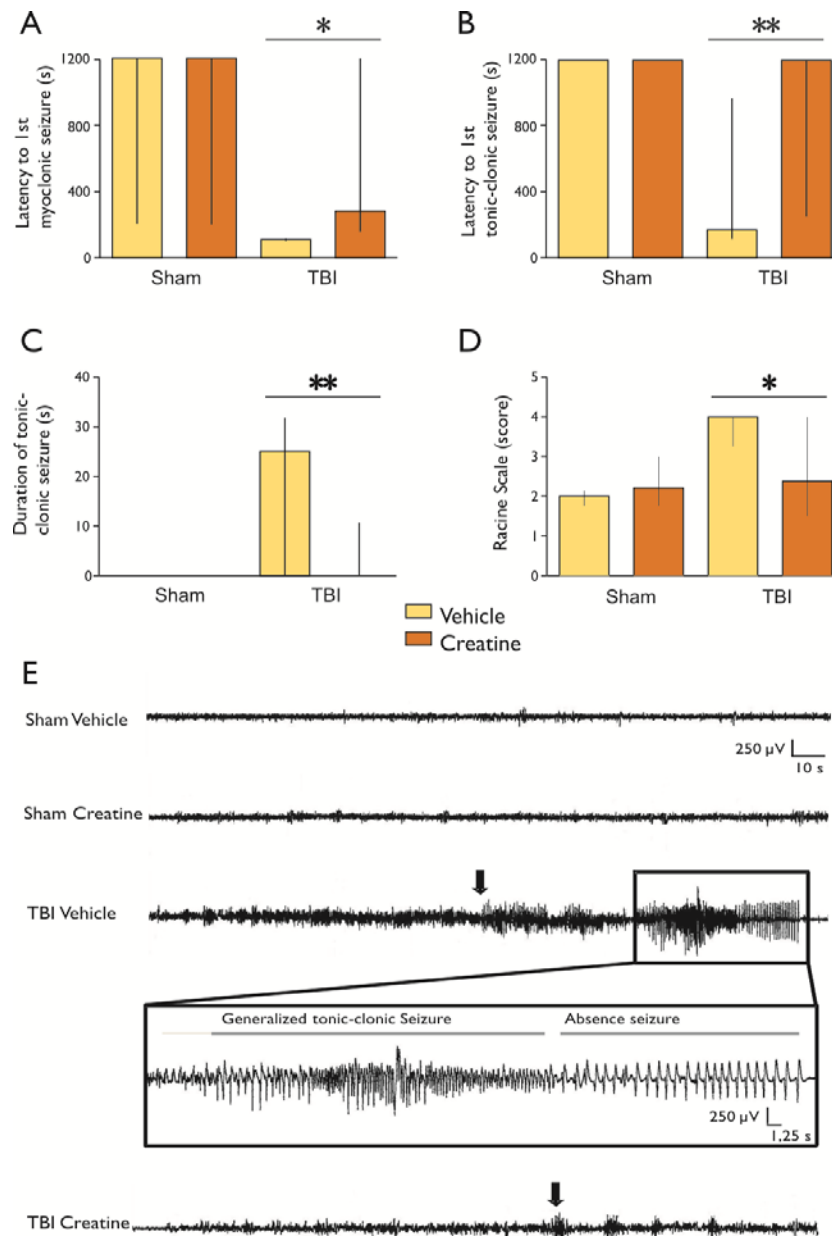


Figure 3: Effect of oral supplementation of creatine in Experiment 3. (A) Latency to the first myoclonic seizures. (B) Latency to the first tonic-clonic seizure. (C) Time spent in generalized tonic-clonic seizure. (D) Racine scale, carried out blindly. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with sham groups (Scheirer-Ray-Hare test). Data are median \pm interquartile ranges for $n = 7-9$ in each group. (E) Representation of EEG events ipsilateral to TBI, all traces in the beginning of pentylenetetrazol administration (35 mg/kg i.p.), black arrow indicating the first myoclonic seizure and highlighted the amplification of the beginning and duration of generalized seizure. The same events occurred in the contralateral side (traces not shown). TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose.

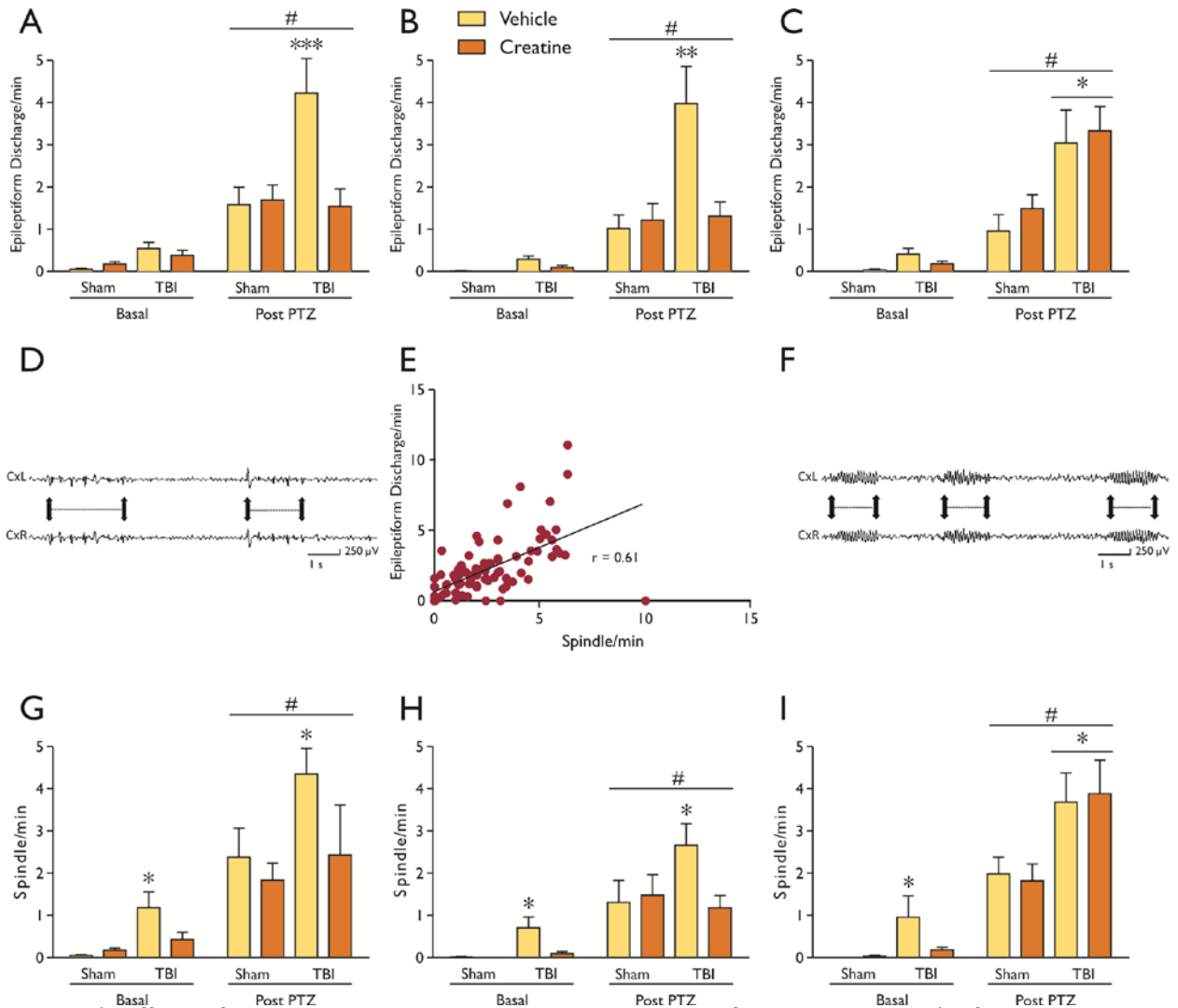


Figure 4: Effect of oral creatine supplementation in epileptiform discharges (defined in the text, represented in D) and spindle oscillations (represented in F) in all experiments. Data from Experiment 1 (A and G), Experiment 2 (B and H) and Experiment 3 (C and I). # $p < 0.0001$ compared Basal and Post-PTZ periods. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.001$ compared TBI-Vehicle with all other groups in the respective time period (Two-way RM ANOVA and Bonferroni tests). (E) Significant correlation ($r = 0.61$, $p < 0.0001$) between epileptiform discharges and spindle oscillations in the sum of all experiments. Basal, 10 minute electroencephalographic recordings 2 h after the last/only supplementation of creatine in Exp1/Exp3 and one week after the creatine discontinuation in Exp2; Post-PTZ, 20 minutes electroencephalographic recordings after PTZ 35 mg/kg i.p. excluding ictal and postictal activities; TBI, traumatic brain injured animals; Vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose; PTZ, pentylenetetrazol; CxL, left parietal cortex; CxR, right parietal cortex.**

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o efeito da suplementação de creatina em um modelo de TCE em ratos sobre a susceptibilidade à convulsões induzidas por PTZ. Os efeitos observados e apresentados no manuscrito acima oferecem evidências de que esse composto possui ação benéfica se utilizado de maneira crônica, diminuindo a susceptibilidade à crises epiléticas, mesmo se suspenso o seu uso por uma semana, após a suplementação por um mês. Esses dados podem sugerir que 1) a creatina possui uma ampla faixa terapêutica, podendo ser iniciada tardiamente e mesmo se retirada por igual período, continua a oferecer benefício e 2) seu efeito ocorreu através de modulação crônica do SNC.

Embora a creatina possua pequena $t_{1/2}$ de eliminação, seu sistema de absorção através de saturação de transportadores e grande $t_{1/2}$ de degradação para creatinina, oferecem uma certa estabilidade por período de horas à dias no organismo (ATASSI et al., 2010; BRAISSANT, 2012; DECHENT et al., 1999; DELDICQUE et al., 2008; MCCALL; PERSKY, 2007; PERASSO et al., 2003). De fato, não foi realizado experimento para verificar a concentração de creatina ao final de sete dias de suspensão (Exp2), mas ao que se pode pensar pela literatura que utilizam modelos em ratos, provavelmente estivesse diminuída em comparação ao período de suplementação (PERASSO et al., 2003). De qualquer forma, a possibilidade de deixar de utilizar um composto por uma semana e o mesmo continuar tendo seu efeito, seja por modulação ou por sua concentração ainda se manter estável, é um ótimo objetivo na farmacoterapia.

Assumindo a probabilidade de que a concentração de creatina esteja reduzida uma semana após sua suspensão, a hipótese de que ela tenha modulado o tecido cerebral se torna interessante. Algumas evidências apontam para essa direção, como experimentos de SULLIVAN et al. (2000) que demonstraram que a suplementação de creatina prévia ao TCE, também por um mês, diminuiu macroscopicamente a perda de tecido cerebral. Em estudo de DUCRAY et al. (2007) demonstram aumento da expressão de receptores GABA-A em cultura de células expostas à creatina. Embora os mecanismos de expressão gênica da creatina não sejam satisfatoriamente elucidados, pode-se gerar a hipótese de que ela tenha tido esse efeito no modelo apresentado por esse estudo. As alterações do sistema GABAérgico são importantes, principalmente no

hipocampo, com mudanças dinâmicas ao longo do tempo após o TCE (PITKANEN; MCINTOSH, 2006). Durante a primeira semana, existe grande excitabilidade hipocampal devido à excesso de glutamato e íons K^+ , a qual se reduz ao longo desse período e em duas semanas, já existe aumento da imunoreatividade para o GABA nessa região. Com o passar de até três meses, porém, observa-se perda de neurônios inibitórios hilares, os quais são responsáveis por aumento da excitabilidade das células granulares (PITKANEN; MCINTOSH, 2006). Essas alterações ao longo do tempo demonstram uma situação fisiopatológica a qual o tecido cerebral tenta aumentar a regulação do sistema GABAérgico e talvez diferenças na expressão desse sistema seja importante para diferenciar o desenvolvimento de EPT dos que não o desenvolvem após o TCE, como também demonstrado pelas alterações de expressão de subunidades e função dos receptores GABA-A hipocâmpais (KHARLAMOV et al., 2011; PAVLOV et al., 2011). Assim, com os efeitos comportamentais observados no presente estudo, associados às evidências da ação da creatina em um sistema de canais iônicos que possuem função inibitória alterada após o TCE, cria-se a hipótese de que a creatina exerça seu efeito clínico através desse sistema biológico.

Porém não apenas no hipocampo, mas também em outras estruturas cerebrais, ocorrem alterações patológicas, como por exemplo, o tálamo. Em modelo muito semelhante ao utilizado nesse estudo, D'AMBROSIO et al. (2004) encontraram aumento de gliose e perdas de células e arquitetura neuronal nessa região. No presente estudo, foram encontradas alterações sugestivas de envolvimento funcional do tálamo, observadas pelas atividades de fuso registradas no córtex. Tipicamente, os fusos são encontrados no sono ou com imobilidade motora em ratos velhos (BUZSAKI, 1991; BUZSAKI et al., 1988), mas também podem ser envolvidos na epilepsia (STERIADE, 2005). De fato, existem diferentes tipos de fuso e algumas diferenças podem estar mais relacionadas com atividade epiléptica de ponta-onda, quando há aumento do componente de frequências beta no fuso (MACKENZIE; POPE; WILLOUGHBY, 2010; SITNIKOVA, 2010). O presente estudo, porém, não analisou diferenças entre os fusos observados. Apenas observou-se correlação geral positiva entre fusos e atividade epileptiforme. Possivelmente existam certas atividades de fuso específicas que se correlacionam com maior intensidade a atividades epiléticas e outras não se relacionem. Investigar essas diferenças poderá refinar o envolvimento fisiopatológico funcional do tálamo com a suscetibilidade a crises epiléticas no TCE.

Dessa forma, além do efeito observado nesse modelo experimental, exercido pela creatina, outras hipóteses surgem para futuros estudos, tanto para aprofundar a explicação biológica do efeito, quanto sobre o envolvimento funcional de diferentes estruturas cerebrais nessa patologia. Além disso, o benefício da suplementação com creatina foi observado em um momento pós-TCE que se aproxima mais da realidade de muitas vítimas, vindo ao encontro de uma ainda tímida coleção de estudos experimentais que abordam esse período como uma oportunidade de intervenção. Como refere THOMPSON et al (2005), os modelos experimentais nem sempre nos dão o que queremos, mas por vezes, nos oferecem o que precisamos. Embora esse estudo não tenha observado o surgimento de crises espontâneas e sua cura com o tratamento proposto, os resultados aqui apresentados podem oferecer maneiras alternativas de se pensar sobre a fisiopatologia que segue o TCE e que a oportunidade terapêutica pode ser mais otimista do que as evidências tem apresentado.

4 CONCLUSÃO

A partir desse estudo, conclui-se que a suplementação de creatina iniciada uma semana após o traumatismo cranioencefálico (TCE) modifica os parâmetros de suscetibilidade à crise epiléptica induzida por subdose de pentilenotetrazol (PTZ).

A creatina aumenta a latência para a primeira crise mioclônica e tônico-clônica generalizada, diminui a duração da crise generalizada bem como diminui as descargas epileptiformes e atividades de fuso.

O efeito sobre os parâmetros de suscetibilidade à convulsão ocorre quando a creatina é administrada continuamente por quatro semanas e é mantido mesmo se suspensa por uma semana após esse período. O único efeito observado na administração única de creatina após cinco semanas foi a diminuição das atividades de fuso basais.

O risco relativo de ser suscetível à crise epiléptica induzida pelo PTZ em ratos com TCE esta diminuído nos animais suplementados com creatina por quatro semanas, mesmo se suspensa por uma semana adicional após esse período. Administração única após cinco semanas não diminui o risco da suscetibilidade à convulsão.

Ainda como conclusão adicional aos objetivos propostos, verificou-se que atividades de fuso e descargas epileptiformes estão positivamente correlacionadas, demonstrando uma possível alteração da atividade talâmica relacionada ao aumento desse marcador de hiperexcitabilidade, não elucidada a relação causa-efeito dessa observação.

Dessa forma, os resultados dessa pesquisa sugerem que é possível ampliar o período de oportunidade terapêutica para o tratamento dos danos originados pelo evento do TCE, ao menos com o uso da creatina, que possui efeito benéfico nos parâmetros comportamentais e eletroencefalográficos observados nesse estudo, com a redução do risco relativo para a suscetibilidade à crises epilépticas induzidas. Além disso, a correlação de atividades epileptiformes registradas no córtex com as atividades de fuso registradas no mesmo local, reforçam a literatura para uma possível relação funcional de estruturas talâmicas nessa patologia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A. et al. Post-traumatic epilepsy: an overview. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 108, n. 5, p. 433-9, Jul 2006. ISSN 0303-8467 (Print) 0303-8467 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225987> >.

ALDERSON, P.; ROBERTS, I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD000196, 2005. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674869> >.

ALMEIDA, L. S. et al. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse**, v. 60, n. 2, p. 118-23, Aug 2006. ISSN 0887-4476 (Print) 0887-4476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715490> >.

ANDELIC, N. The epidemiology of traumatic brain injury. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 1, p. 28-9, Jan 2013. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23177533> >.

ANDRES, R. H. et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull**, v. 76, n. 4, p. 329-43, Jul 1 2008. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502307> >.

ATASSI, N. et al. A phase I, pharmacokinetic, dosage escalation study of creatine monohydrate in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotroph Lateral Scler**, v. 11, n. 6, p. 508-13, Dec 2010. ISSN 1471-180X (Electronic) 1471-180X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20698808> >.

BAO, Y. H. et al. Post-traumatic seizures exacerbate histopathological damage after fluid-percussion brain injury. **J Neurotrauma**, v. 28, n. 1, p. 35-42, Jan 2011. ISSN 1557-9042 (Electronic) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836615> >.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795> >.

BERTRAM, E. H.; ZHANG, D. X. Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 15-26, 1999. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392827> >.

BOLKVADZE, T.; PITKANEN, A. Development of post-traumatic epilepsy after controlled cortical impact and lateral fluid-percussion-induced brain injury in the mouse. **J Neurotrauma**, v. 29, n. 5, p. 789-812, Mar 20 2012. ISSN 1557-9042 (Electronic) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023672> >.

BRAISSANT, O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. **J Inherit Metab Dis**, v. 35, n. 4, p. 655-64, Jul 2012. ISSN 1573-2665 (Electronic) 0141-8955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252611> >.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Uma análise da mortalidade no Brasil e Regiões**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421 >

BUZSAKI, G. The thalamic clock: emergent network properties. **Neuroscience**, v. 41, n. 2-3, p. 351-64, 1991. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870695> >.

BUZSAKI, G. et al. Electric activity in the neocortex of freely moving young and aged rats. **Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 735-44, Sep 1988. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3200427> >.

CASSIDY, J. D. et al. Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. **J Rehabil Med**, n. 43 Suppl, p. 28-60, Feb 2004. ISSN 1650-1977 (Print) 1650-1977 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15083870> >.

CEDERBERG, D.; SIESJO, P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? **Childs Nerv Syst**, v. 26, n. 2, p. 221-6, Feb 2010. ISSN 1433-0350 (Electronic) 0256-7040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940996> >.

CONTRERAS, D. et al. Spatiotemporal patterns of spindle oscillations in cortex and thalamus. **J Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 1179-96, Feb 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994070> >.

D'AMBROSIO, R. et al. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. **Brain**, v. 127, n. Pt 2, p. 304-14, Feb 2004. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607786> >.

D'AMBROSIO, R. et al. Progression from frontal-parietal to mesial-temporal epilepsy after fluid percussion injury in the rat. **Brain**, v. 128, n. Pt 1, p. 174-88, Jan 2005. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563512> >.

D'AMBROSIO, R. et al. Functional definition of seizure provides new insight into post-traumatic epileptogenesis. **Brain**, v. 132, n. Pt 10, p. 2805-21, Oct 2009. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755519> >.

DE OLIVEIRA THAIS, M. E. et al. Limited predictive power of hospitalization variables for long-term cognitive prognosis in adult patients with severe traumatic brain injury. **J Neuropsychol**, Nov 20 2012. ISSN 1748-6653 (Electronic) 1748-6645 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167479> >.

DE SILVA, M. J. et al. **Patient outcome after traumatic brain injury in high-, middle- and low-income countries: analysis of data on 8927 patients in 46 countries.** *Int J Epidemiol.* 38: 452-8 p. 2009.

DECHENT, P. et al. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-mono-hydrate. **Am J Physiol**, v. 277, n. 3 Pt 2, p. R698-704, Sep 1999. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484486> >.

DELDICQUE, L. et al. Kinetics of creatine ingested as a food ingredient. **Eur J Appl Physiol**, v. 102, n. 2, p. 133-43, Jan 2008. ISSN 1439-6327 (Electronic) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851680> >.

DODD, J. R. et al. Functional and immunocytochemical characterization of the creatine transporter in rat hippocampal neurons. **J Neurochem**, v. 115, n. 3, p. 684-93, Nov 2010. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731764> >.

DUCRAY, A. D. et al. Creatine promotes the GABAergic phenotype in human fetal spinal cord cultures. **Brain Res**, v. 1137, n. 1, p. 50-7, Mar 16 2007. ISSN 0006-8993

(Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223088> >.

FALAVIGNA, A. et al. Impact of an injury prevention program on teenagers' knowledge and attitudes: results of the Pense Bem-Caxias do Sul Project. **J Neurosurg Pediatr**, v. 9, n. 5, p. 562-8, May 2012. ISSN 1933-0715 (Electronic) 1933-0707 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546036> >.

FARRANT, M.; NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 215-29, Mar 2005. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738957> >.

FEIGIN, V. L. et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 1, p. 53-64, Jan 2013. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23177532> >.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939> >.

FUENTEALBA, P.; STERIADE, M. The reticular nucleus revisited: intrinsic and network properties of a thalamic pacemaker. **Prog Neurobiol**, v. 75, n. 2, p. 125-41, Feb 2005. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784303> >.

GLAUSER, T. et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1094-120, Jul 2006. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886973> >.

GOLARAI, G. et al. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. **J Neurosci**, v. 21, n. 21, p. 8523-37, Nov 1 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606641> >.

GUALANO, B. et al. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. **Amino Acids**, v. 38, n. 1, p. 31-44, Jan 2010. ISSN 1438-2199 (Electronic) 0939-4451 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253023> >.

HARRIS, J. L. et al. Altered neurochemical profile after traumatic brain injury: (1)H-MRS biomarkers of pathological mechanisms. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 12, p. 2122-34, Dec 2012. ISSN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892723> >.

IMMONEN, R. J. et al. Distinct MRI pattern in lesional and perilesional area after traumatic brain injury in rat--11 months follow-up. **Exp Neurol**, v. 215, n. 1, p. 29-40, Jan 2009. ISSN 1090-2430 (Electronic) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929562> >.

IPSIROGLU, O. S. et al. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. **Life Sci**, v. 69, n. 15, p. 1805-15, Aug 31 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11665842> >.

JAVOUHEY, E.; GUERIN, A. C.; CHIRON, M. Incidence and risk factors of severe traumatic brain injury resulting from road accidents: a population-based study. **Accid Anal Prev**, v. 38, n. 2, p. 225-33, Mar 2006. ISSN 0001-4575 (Print) 0001-4575 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242108> >.

JENSEN, F. E. Introduction. Posttraumatic epilepsy: treatable epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 1-3, Feb 2009. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187287> >.

KHARATISHVILI, I. et al. Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. **Brain**, v. 130, n. Pt 12, p. 3155-68, Dec 2007. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055492> >.

KHARATISHVILI, I. et al. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. **Neuroscience**, v. 140, n. 2, p. 685-97, Jun 30 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650603> >.

KHARATISHVILI, I.; PITKANEN, A. Posttraumatic epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 2, p. 183-8, Apr 2010. ISSN 1473-6551 (Electronic) 1080-8248 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20125011> >.

KHARLAMOV, E. A. et al. Alterations of GABA(A) and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in

posttraumatic epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 95, n. 1-2, p. 20-34, Jun 2011. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439793> >.

KOGA, Y. et al. Brain creatine functions to attenuate acute stress responses through GABAergic system in chicks. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 65-71, 2005. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780467> >.

LANGLOIS, J. A.; RUTLAND-BROWN, W.; WALD, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **J Head Trauma Rehabil**, v. 21, n. 5, p. 375-8, Sep-Oct 2006. ISSN 0885-9701 (Print) 0885-9701 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983222> >.

LESCOT, T. et al. Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 1, p. 85-94, Jan 2010. ISSN 1557-9042 (Electronic) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705964> >.

LOWENSTEIN, D. H. Epilepsy after head injury: an overview. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 4-9, Feb 2009. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187288> >.

MAAS, A. I. et al. Re-orientation of clinical research in traumatic brain injury: report of an international workshop on comparative effectiveness research. **J Neurotrauma**, v. 29, n. 1, p. 32-46, Jan 1 2012. ISSN 1557-9042 (Electronic) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21545277> >.

MAAS, A. I.; ROOZENBEEK, B.; MANLEY, G. T. Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 115-26, Jan 2010. ISSN 1878-7479 (Electronic) 1878-7479 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129503> >.

MACKENZIE, L.; POPE, K. J.; WILLOUGHBY, J. O. EEG spindles in the rat: evidence for a synchronous network phenomenon. **Epilepsy Res**, v. 89, n. 2-3, p. 194-206, May 2010. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138736> >.

MAGNI, D. V. et al. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Res**, v. 1185, p. 336-45, Dec 14 2007. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950259> >.

MAK, C. S. et al. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 571-85, Oct 6 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580854> >.

MARTINS, H. S.; DAMASCENO, M. C. de T.; AWADA, S. B. **Pronto-Socorro:** condutas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Barueri: Manole, 2008.

MATHERN, G. W. et al. Traumatic compared to non-traumatic clinical-pathologic associations in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 19, n. 2, p. 129-39, Oct 1994. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843168> >.

MAXWELL, W. L. et al. There is differential loss of pyramidal cells from the human hippocampus with survival after blunt head injury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 3, p. 272-9, Mar 2003. ISSN 0022-3069 (Print) 0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12638731> >.

MCCALL, W.; PERSKY, A. M. Pharmacokinetics of creatine. **Subcell Biochem**, v. 46, p. 261-73, 2007. ISSN 0306-0225 (Print) 0306-0225 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652081> >.

MCINTOSH, T. K. et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. **Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 233-44, 1989. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2761692> >.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 11, p. 1637-40, Nov 2010. ISSN 1532-821X (Electronic) 0003-9993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21044706>>.

OLIVEIRA, R. A. et al. Glasgow outcome scale at hospital discharge as a prognostic index in patients with severe traumatic brain injury. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 8, p. 604-8, Aug 2012. ISSN 1678-4227 (Electronic) 0004-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899032> >.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Fact sheet number 999**. Genebra, Suíça, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>. Acesso em 25 dez. 2012.

PATERGNANI, S. et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 19, 2011. ISSN 1478-811X (Electronic) 1478-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21939514> >.

PAVLOV, I. et al. Progressive loss of phasic, but not tonic, GABAA receptor-mediated inhibition in dentate granule cells in a model of post-traumatic epilepsy in rats. **Neuroscience**, v. 194, p. 208-19, Oct 27 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840377> >.

PERASSO, L. et al. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. **Brain Res**, v. 974, n. 1-2, p. 37-42, Jun 6 2003. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742622> >.

PITKANEN, A. et al. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 21-9, Feb 2009. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187291> >.

PITKANEN, A. et al. Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 2, p. 13-20, 2007. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571349> >.

PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 2, p. 173-86, Feb 2011. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256455> >.

PITKANEN, A.; MCINTOSH, T. K. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 241-61, Feb 2006. ISSN 0897-7151 (Print) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503807> >.

RAMBO, L. M. et al. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylentetrazol-induced seizures. **Amino Acids**, Oct 12 2012. ISSN 1438-2199 (Electronic) 0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064877> >.

RAMBO, L. M. et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylentetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n.

5, p. 333-40, Sep 2009. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393274> >.

ROYES, L. F. et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 1079-90, 2003. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732252> >.

ROYES, L. F. et al. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. **Neurochem Int**, v. 53, n. 1-2, p. 33-7, Jul 2008. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541342> >.

ROYES, L. F. et al. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 136-44, Jan 2006. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469366> >.

SAKELLARIS, G. et al. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **J Trauma**, v. 61, n. 2, p. 322-9, Aug 2006. ISSN 0022-5282 (Print) 0022-5282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917445> >.

SAKELLARIS, G. et al. Prevention of traumatic headache, dizziness and fatigue with creatine administration. A pilot study. **Acta Paediatr**, v. 97, n. 1, p. 31-4, Jan 2008. ISSN 0803-5253 (Print) 0803-5253 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053002> >.

SAYER, F. T.; KRONVALL, E.; NILSSON, O. G. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. **Spine J**, v. 6, n. 3, p. 335-43, May-Jun 2006. ISSN 1529-9430 (Print) 1529-9430 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651231> >.

SINGH, I. N. et al. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 11, p. 1407-18, Nov 2006. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16538231> >.

SITNIKOVA, E. Thalamo-cortical mechanisms of sleep spindles and spike-wave discharges in rat model of absence epilepsy (a review). **Epilepsy Res**, v. 89, n. 1, p. 17-

26, Mar 2010. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828296> >.

SULLIVAN, P. G. et al. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. **Ann Neurol**, v. 48, n. 5, p. 723-9, Nov 2000. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079535> >.

SUPORTE AVANÇADO DE VIDA NO TRAUMA – PROGRAMA PARA MÉDICOS (ATLS®). **Colégio Americano de Cirurgiões**. Chicago: American College of Surgeons, 2004.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-4, Jul 13 1974. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4136544> >.

TEMKIN, N. R. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 10-3, Feb 2009. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187289> >.

THOMPSON, H. J. et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. **J Neurotrauma**, v. 22, n. 1, p. 42-75, Jan 2005. ISSN 0897-7151 (Print) 0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665602> >.

VANDAME, D. et al. Comparison of the pharmacological properties of GK11 and MK801, two NMDA receptor antagonists: towards an explanation for the lack of intrinsic neurotoxicity of GK11. **J Neurochem**, v. 103, n. 4, p. 1682-96, Nov 2007. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908242> >.

WALLIMANN, T.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; SCHLATTNER, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1271-96, May 2011. ISSN 1438-2199 (Electronic) 0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21448658> >.